

緑藻の CO₂ 濃縮機構におけるピレノイドデンプン鞘の役割

豊川 知華

目次

要旨

略語表

序論

1. 光合成生物の CO₂ 欠乏ストレス応答1
2. 水圏環境における藻類の CO₂ 濃縮機構1
3. ピレノイド4
4. 低 CO₂ 誘導性タンパク質 LCIB7
5. CO₂ 濃度依存的な LCIB の機能モデル12
6. デンプン枝切り酵素イソアミラーゼ 115

目的18

結果

1. 葉緑体における溶存 CO₂ 濃度依存的な LCIB の局在変化19
2. LCIB 局在異常株の単離30
3. LCIB 局在異常株 4-D1 におけるデンプン鞘の形態と LCIB の局在との関係33
4. デンプン合成変異株におけるデンプン鞘の形態と LCIB の局在との関係39
5. デンプン合成変異株の生育と光合成特性45

考察

1. LCIB の局在変化は溶存 CO₂ 濃度に依存する51
2. デンプン鞘形成は CCM に必要である52
3. デンプン鞘形成は LCIB のピレノイド周囲への局在化に必要である53
4. 4-D1 における *ISAI* 遺伝子発現量55
5. デンプン合成阻害が光合成に与える影響56
6. ピレノイド周囲における CO₂ リサイクルモデル56
7. LCIB がピレノイド周囲に集合する機構59

結論	62
実験材料および方法	63
参考文献	75
謝辞	86

要旨

水圏環境下では、CO₂固定酵素 ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) の基質となる CO₂ の拡散速度が大気中に比べて低く、藻類は CO₂ 欠乏ストレスに曝される。CO₂ 欠乏ストレス環境下でも光合成を維持するために、藻類は無機炭素 (CO₂ と HCO₃⁻) を細胞内に輸送し、Rubisco 周囲に CO₂ を濃縮する CO₂ 濃縮機構 (CO₂-concentrating mechanism; CCM) を持つ。CCM は光存在下かつ CO₂ 欠乏条件で誘導され、それと同時に葉緑体ストロマ中で Rubisco が集積したピレノイドが発達し、その周囲にデンプン鞘が形成される。さらに、緑藻クラミドモナスでは、β型炭酸脱水酵素と推定されているタンパク質 Low-CO₂ inducible protein B (LCIB) が、葉緑体ストロマからピレノイド周囲に移動する。LCIB はピレノイドから漏出する CO₂ のリサイクルに関わると考えられているが、そのピレノイドへの局在化に必要な因子は明らかにされていなかった。本研究では、LCIB がピレノイド周囲に局在化するために必要な環境条件ならびに新規因子を明らかにすることを目的とした。

通気する空気中の CO₂ 濃度、pH 条件、培地中の溶存無機炭素濃度、ならびに光照射条件を検討したところ、LCIB がピレノイド周囲に局在変化するために、培地中の溶存全無機炭素濃度や溶存 HCO₃⁻ 濃度の低下ではなく、溶存 CO₂ 濃度が 7 μM 未満に低下する超低 CO₂ 条件が必要であることが判明した。また、LCIB がピレノイド周囲へ局在化するためにはタンパク質の新規合成は必要なく、LCIB 自身が葉緑体内を移動することが示唆された。

従来は LCIB のピレノイド周囲への移動は光と光合成を介した制御を受けると考えられていたが、細胞を超低 CO₂ 条件かつ光照射後に暗所または光合成電子伝達阻害剤添加条件に移しても、溶存 CO₂ 濃度が 7 μM 未満に低下すれば LCIB の移動が起こることから、LCIB の移動に光照射が必須ではなく、超低 CO₂ 条件かつ光照射時において蓄積する何らかの因子が存在する可能性が示唆された。

次に、超低 CO₂ 条件において LCIB が分散する局在異常株 4-D1 を単離した。この変異株では、タグ遺伝子の挿入変異によりデンプン合成酵素イソアミラーゼ 1 (ISA1) が欠損し、ピレノイドの周囲のデンプン鞘が形成されなかった。4-D1 株において、LCIB はピレノイド周囲への集合が遅延し、さらに葉緑体基底側に異常凝集した。さら

に 4-D1 株は、超低 CO₂ 条件における生育の遅延、光合成における無機炭素に対する親和性の低下、ならびに細胞膜局在型の HCO₃⁻ 輸送体の蓄積レベルの低下を示した。デンプン合成に関わる α -1,4 グルカノトランスフェラーゼの変異株 *sat11-1* もデンプン鞘を欠損し、4-D1 株と同様の表現型を示した。

以上の結果から、LCIB のピレノイド周囲への移動が溶存 CO₂ 濃度の低下に依存すること、これまで役割が明確でなかったピレノイド周囲に形成されるデンプン鞘が、LCIB のピレノイド周囲への局在化と、CCM の駆動に伴う超低 CO₂ 条件における無機炭素親和性の維持に必要であることを示した。

略語表

ABC	Adenosine triphosphate-binding cassette
ADP	Adenosine diphosphate
CA	Carbonic anhydrase
CAM	Crassulacean acid metabolism
CCM	CO ₂ -concentrating mechanism
Chl	Chlorophyll
CHX	Cycloheximide
Ci	Inorganic carbon
CV	Coefficient of variation
DCMU	3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea
DIC	Differential interference contrast
FCCP	Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone
HC	High-CO ₂
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HLA3	High-light activated 3
HSP70A	Heat shock protein 70A
K _{0.5} (Ci)	Inorganic carbon concentration required for half-maximal rate of O ₂ -evolution
LC	Low-CO ₂
LCI	Low-CO ₂ -inducible
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
mt	Mating type
OD	Optical density
PBS	Phosphate-buffered saline
PGA	Phosphoglycerate
PVDF	Polyvinylidene difluoride
qRT-PCR	Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
Rubisco	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase
RbcL	Rubisco large subunit
RBCS2	Rubisco small subunit 2
RuBP	Ribulose-1,5-bisphosphate
TAP	Tris-acetate-phosphate
TAIL-PCR	Thermal asymmetric interlaced polymerase chain reaction
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
UTR	Untranslated region
VLC	Very low-CO ₂
V _{max}	Maximum rate of photosynthetic oxygen evolution
WT	Wild-type

序論

1. 光合成生物の CO₂ 欠乏ストレス応答

光合成生物は、光エネルギーを化学エネルギーへと変換し、大気中の CO₂ を固定する。光合成に影響を与える環境要因として、光の強さ・波長、CO₂ 濃度、温度、水の供給などが挙げられる。自然界ではこれらの要因は常に変動するため、藻類や陸上植物は生息する環境要因の変化に応答して光合成を最適化する必要がある。

光合成の炭酸固定で働く CO₂ 固定酵素 ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) は、無機炭素 (Ci; CO₂, HCO₃⁻, CO₃²⁻) のうち CO₂ のみを基質とするため、CO₂ を細胞内に取り込む過程は光合成の律速となる要因の一つである。陸上植物では、気孔の開閉により葉内への CO₂ の取り込み量を調節し (Engelmann et al., 2016)、さらにアクアポリンが細胞膜を介した CO₂ の受動輸送を促進する (Uehlein et al., 2003; Hanba et al., 2004)。また C₄ 植物、CAM 植物および藻類は、CO₂ 欠乏ストレス環境下でも効率的な CO₂ 固定を行うために CO₂ 濃縮機構 (CO₂-concentrating mechanism; CCM) を持つ。CCM とは、Rubisco 周囲の CO₂ 濃度を上昇させることで高効率な CO₂ 固定を行い、光合成における Ci への親和性を上昇させる生理学的な現象を指す。C₄ 植物は、葉肉細胞に取り込まれた CO₂ をオキサロ酢酸などの C₄ 化合物に変換し、維管束鞘細胞で C₄ 化合物から CO₂ を遊離することで Rubisco 近傍に CO₂ を濃縮する。CAM 植物は、夜間に CO₂ をオキサロ酢酸などの C₄ 化合物として固定し、昼間に C₄ 化合物から CO₂ を遊離してカルビン・ベンソン回路に供給する。一方、水中に生息する藻類は、C₄ 植物や CAM 植物とは異なる CCM を進化的に獲得した。

2. 水圏環境における藻類の CO₂ 濃縮機構

藻類が生息する水圏環境では、CO₂ の拡散速度は大気中における拡散速度の約 10,000 分の 1 と低く (Jones et al., 1992)、中性からアルカリ性の条件では、CO₂ は水と反応して主に重炭酸イオン (HCO₃⁻) の形で多く存在する。そのため、水圏環境では Rubisco への CO₂ 供給が制限され、藻類はしばしば CO₂ 欠乏ストレスに曝される。藻類は、Ci 輸送体および炭酸脱水酵素によって細胞外から Ci を直接細胞内に能動的に取り込む生物物理的な CCM を持つ。藻類が CCM を持つことは、約 40 年前に緑藻クラミドモナス

Chlamydomonas reinhardtii (Badger et al., 1980)、緑藻クロレラ *Chlorella vulgaris* (Hogetsu and Miyachi, 1977)、シアノバクテリア *Anabaena variabilis* (Kaplan et al., 1980) を用いて生理学的に示された。例えば、3–5%程度の高濃度の CO₂ を含む空気を通気する条件でこれらの微細藻を生育させた場合は、光合成における C_i に対する細胞の親和性は低い。しかし、大気レベル (0.04%) の低濃度の CO₂ を含む空気を通気する条件で生育させた場合では、細胞は CCM を誘導し、CO₂ が欠乏しているにも関わらず C_i に対して高い親和性を示し、効率的な光合成を行う。

藻類の CCM では、CO₂ 欠乏条件下で誘導される C_i 輸送体によって細胞内に C_i が能動的に輸送され、細胞内に高濃度の C_i プールを形成する。C_i プールの C_i 濃度は種によって差はあるが、細胞外 C_i 濃度の数倍から数千倍に達する (Badger et al. 1998)。C_i プールの形成には、CO₂ を濃縮する場として発達する Rubisco が集積した細胞内構造が重要である。シアノバクテリアでは細胞質に発達するカルボキシソーム (Cameron et al., 2013)、真核藻類では葉緑体内に発達するピレノイドがその機能を担う (Badger et al., 1998; Meyer et al., 2017)。Rubisco は、Ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) に CO₂ を結合して 3-phosphoglycerate (3-PGA) を生成するカルボキシラーゼ反応だけでなく、RuBP に O₂ を結合して 2-phosphoglycerate (2-PGA) を生成するオキシゲナーゼ反応も触媒する。カルボキシラーゼ反応とオキシゲナーゼ反応は、Rubisco の同じ活性中心で競合的に起こるため、水中の CO₂ 欠乏環境では Rubisco の触媒反応はオキシゲナーゼ反応に傾きやすくなる。藻類の CCM では、カルボキシソームおよびピレノイド内部の CO₂ 濃度を高めることで、オキシゲナーゼ反応を抑制し、炭酸固定を効率的に行う (Raven et al., 2003)。カルボキシソームは α 型と β 型の 2 種類に分類され、それぞれ CCM に貢献する (Rae et al., 2013; Kerfeld and Melnicki, 2016)。カルボキシソームの内部には Rubisco および HCO₃⁻ を CO₂ へと変換する β 型炭酸脱水酵素が含まれている。カルボキシソームは主に、シェルタンパク質である CcmK2、CcmK3 および CcmK4 と、Rubisco とシェルタンパク質のリンカータンパク質として機能する CcmM および CcmN によって構成される二十面体のシェル構造によって囲まれている (Kerfeld et al., 2005)。カルボキシソームの規則的なシェル構造は CO₂ の漏出を防ぐ物理的なバリアとして機能し、さらに Rubisco の基質となる C_i や生成物を選択的に通過させることで酵素反応を促進すると考えられて

いる (Yeated et al., 2010; Bobik et al., 2015)。シアノバクテリアが持つ CCM 構成因子は真核藻類には保存されていないことから、進化上の CCM の獲得は、約 4.5 億年前に始まった陸上植物の繁茂による急激な大気組成の変化 (O_2 濃度の上昇と CO_2 濃度の減少) に適応するために独立して生じたと考えられている (Raven, 1997)。

真核藻類における CCM の研究は、緑藻クラミドモナスを用いてその分子機構について多くの知見が蓄積されている。クラミドモナスはゲノム情報が解読されていること (Merchant et al., 2007)、形質転換系が確立されていること (Shimogawara et al., 1998; Yamano et al., 2013)、大規模挿入変異株ライブラリーやゲノム編集などの分子遺伝学的ツールが整備されていること (Jinkerson et al., 2015; Li et al., 2016; Greiner et al., 2017)、四分子解析を用いた遺伝解析が可能であることなどの理由から (Dutcher, 1995)、モデル生物として広く用いられている。クラミドモナスは光合成で固定した炭素を用いて生育する光独立栄養条件と、培地中の酢酸を有機炭素として資化する従属栄養条件 (Sager and Granick, 1953)、さらにそれらを組み合わせた混合栄養条件において生育が可能である。特に、従属栄養条件では光合成遺伝子に欠損がある変異株の培養も可能となるため、クラミドモナスは光合成研究に広く用いられている (Harris, 1989)。

大気レベルの 0.04% CO_2 を通気したクラミドモナスは CCM を誘導し、5% CO_2 通気条件に順化した細胞より光合成における C_i への親和性が上昇する (Badger et al., 1980; Jordan and Ogren, 1981; Spalding et al., 1983; Moroney and Tolbert, 1985)。これ以降は、0.04% CO_2 通気条件を低 CO_2 (low- CO_2 ; LC) 条件、5% CO_2 通気条件を高 CO_2 (high- CO_2 ; HC) 条件と呼ぶ。

これまでに、HC 条件と LC 条件における網羅的なトランスクリプトーム解析 (Miura et al., 2004; Wang et al., 2005; Yamano et al., 2008; Yamano and Fukuzawa, 2009; Fang et al., 2012)、HC 条件では生育できるが LC 条件では致死あるいは生育が遅延する HC 要求性変異株の解析 (Fukuzawa et al., 1998; Wang et al., 2014; Wang et al., 2016; Itakura et al., 2019)、ピレノイドのプロテオーム解析 (Mackinder et al., 2016) から、CCM に関わる HCO_3^- 輸送体、炭酸脱水酵素、制御因子、ピレノイドの構成因子が同定されてきた。

また、CCM は光と CO_2 濃度だけでなく、概日リズムによっても制御される (Marcus et al., 1986)。CCM 関連因子の遺伝子発現は、明期に入る直前の暗期に上昇することや

(Mitchell et al., 2014)、暗期から明期に移したとき、Rubisco と炭酸脱水酵素 CAH3 などがピレノイドへ局在する割合が上昇することが示されている (Mitchell et al., 2014; Tirumani et al., 2014)。

3. ピレノイド

真核藻類は、葉緑体の中に鮮明な顆粒として観察されるピレノイドを形成する (pyrenoid: ギリシャ語で pyren: 果実の核、eidōs: 形)。ピレノイドは、1882 年に Schmitz によって命名され (Schmitz, 1882)、多くの真核藻類に存在する。ピレノイドの有無、位置、形状や数は同一種内で安定しているため、ピレノイドの形態は藻類の分類学的指標として用いられる。陸上植物は一般的に葉緑体中にピレノイドを持たないため、ピレノイドは植物の陸上化に伴って消失したと考えられている。唯一の例外として、陸上植物のツノゴケ類の一部がピレノイドを有しており、CCM を持つ (Smith and Griffiths, 1996)。

淡水性の単細胞緑藻クラミドモナスは、細胞側面に光受容装置である眼点を、細胞前端に遊泳に必要な 2 本の鞭毛を有している (図 1-1A)。細胞内にカップ状の葉緑体を持ち、その内部には 1 個のピレノイドを形成し、その構造は環境変化に応じて変化する。クラミドモナスを HC 条件から LC 条件に移すと、CCM の誘導に伴い、ピレノイドのサイズが増大する (Kuchitsu et al., 1991; Fukuzawa et al., 2001)。HC 条件では全 Rubisco の約 40% がピレノイドに局在しているが、LC 条件では全 Rubisco の約 90% がピレノイドに局在する (Borkhsenius et al., 1998)。また、ピレノイドは Rubisco が結晶状に集積した固い構造であると考えられていたが、クラミドモナスのピレノイドは液-液相分離する膜のないオルガネラであることが示された (Freeman Rosenzweig et al., 2017)。Rubisco とその相互作用タンパク質 Essential Pyrenoid Component 1 (EPYC1) を混合することで、*in vitro* で液-液相分離するドロレットを形成することも報告された (Wunder et al., 2018)。さらに、細胞内から精製したピレノイドのプロテオーム解析により 190 個のタンパク質が検出されており (Zhan et al., 2018)、89 個のタンパク質がピレノイドに局在することが示された (Mackinder et al., 2017)。

LC 条件において、ピレノイドの周囲には複数のデンブプレートが形成され、デンブプレートがピレノイドを取り囲むようにリング状になったものはデンブ鞘と呼

ばれる (図 1-1A)。デンプンプレート同士の間隙は約 100 nm であり、その隙間にチラコイド膜が貫入し、ピレノイドチューブと呼ばれている (図 1-1B,C,D,E)。電子顕微鏡観察より、ピレノイドチューブ内部にさらに細いミニチューブが存在すること示唆されていた (Ohad et al., 1967)。近年のクライオ電子顕微鏡観察によりピレノイド内部の三次元構造が明らかになり、ピレノイドチューブ内部に存在する複数のミニチューブが、ピレノイド内部と葉緑体ストロマを連結していることが示された (図 1-1F,G,H,I; Engel et al., 2015)。このミニチューブは、glyceraldehyde 3-phosphate (G3P) などの光合成代謝産物や ATP をピレノイド外に輸送している可能性が指摘されている (Engel et al., 2015)。

また、ピレノイドチューブには酸素を発生する光化学系 II は見出されず、光化学系 I の活性のみが検出される。これは、ピレノイド内部では Rubisco を O₂ から隔離することで、Rubisco のオキシゲナーゼ活性を抑制しているためだと考えられている (McKay and Gibbs, 1991)。

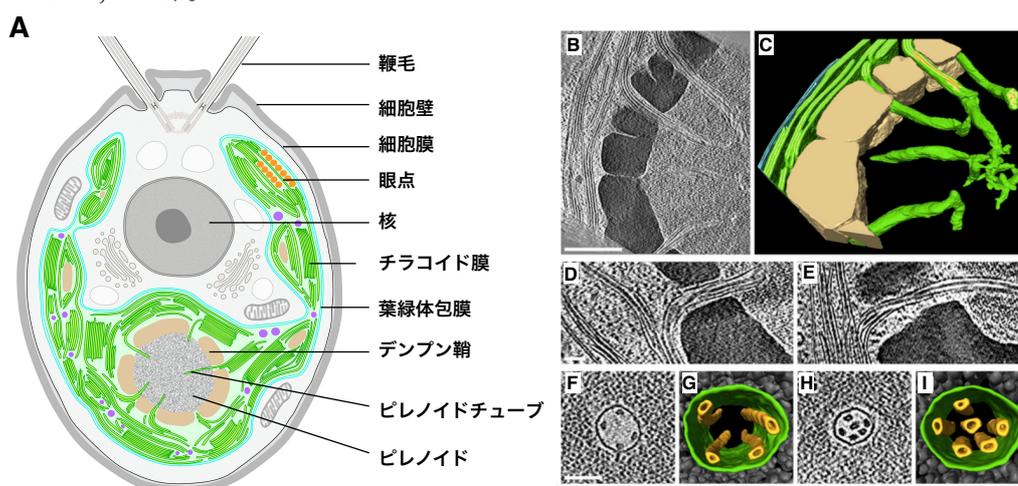


図 1-1. 緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* の細胞内模式図とピレノイド領域の微細構造 (Max Planck 研究所の Benjamin Engel 博士より提供された図および Engel et al., 2015 を改変)

(A) クライオ電子顕微鏡法による観察をもとに描かれたクラミドモナスの細胞内構造。細胞の大きさは 6–10 μm。

(B–I) クライオ電子顕微鏡によるピレノイドチューブおよびピレノイドミニチューブの三次元構造。(B,D,E,F,H) はクライオ電子顕微鏡によって撮像された高倍率電子線トモグラフィー写真を、(C,G,I) はクライオ電子顕微鏡像をもとに作製された三次元構造図を示す。

(B) ピレノイドの高倍率電子線トモグラフィー写真。スケールバーは 500 nm。

(C) (B)の画像をもとに作製されたピレノイドの立体構造。チラコイド膜 (暗緑色)、チラコイドルーメン (薄緑色)、ピレノイドミニチューブ (橙色)、葉緑体包膜 (青色)、ピレノイドデンプン鞘 (黄褐色)。

(D,E) スタック状のチラコイド膜からピレノイドチューブへ、どのように貫入するのかを示す高倍率電子線トモグラフィー写真。スケールバーは 100 nm。

(F,H) ピレノイドマトリックスの高倍率電子線トモグラフィー写真。スケールバーは 100 nm。

(G,I) (F,H)の画像をもとに作製されたピレノイドチューブの断面図。ピレノイドチューブ (緑色)、ピレノイドミニチューブ (橙色)、Rubisco 複合体 (グレー色)。

クラミドモナスにおけるデンブン鞘は、光存在下で CO₂ 欠乏ストレスに応答して発達する。HC 条件から LC 条件に移すと 5 時間以内にデンブン鞘が形成され、同時に葉緑体ストロマのデンブン粒が分解される (Kuchitsu et al., 1988; Ramazanov et al., 1994)。LC 条件で培養した定常期の細胞ではデンブン鞘形成が飽和し、ストロマデンブンが出現する (Kuchitsu et al., 1988)。また LC 条件から HC 条件に移すと、デンブン鞘が分解され、ストロマのデンブン粒が形成される (Kuchitsu et al., 1988; Ramazanov et al., 1994)。このデンブン鞘の形成は、暗条件または光合成電子伝達の阻害剤 DCMU の添加により阻害されることから、光依存的であることが示されている (Kuchitsu et al., 1988)。また、LC 条件に順化した細胞を HC 条件に移すと、デンブン鞘は分解されていくが、完全に分解されるには約 72 時間を要する (Ramazanov et al., 1994)。デンブン鞘が形成されるタイミングは、CCM が完全に誘導されるタイミング (LC 条件に移して 6 時間後) とほぼ一致する。このことから、デンブン鞘がピレノイドから漏れ出る CO₂ の拡散を防ぐ物理的な障壁として働くモデルが提唱された (Ramazanov et al., 1994)。一方で、クラミドモナスおよびクロレラ *Chlorella pyrenoidosa* において、デンブン鞘が形成されないデンブン合成変異株でも CCM が誘導されることが確認されており、デンブン鞘の形成は CCM に必ずしも必要ではないと議論している報告もある (Villarejo et al., 1996; Plumed et al., 1996)。しかし、これらの論文では変異株の親株とは異なる野生株を比較に用いている点や、相補株を用いた詳細な実験が不足している問題点があった。

最近、クラミドモナスのデンブン鞘の形態が異常になった StArch Granules Abnormal 1 (SAGA1) の変異株 *saga1* が単離され、デンブン鞘の形成と CCM との関係を改めて示唆する論文が報告された (Itakura et al., 2019)。*saga1* 株ではピレノイドの個数が平均で約 10 個に増え、LC 条件で生育が遅延した。SAGA1 はデンブン鞘の伸長を抑制する機能を持つと推測されており、この SAGA1 が欠損するとデンブン鞘が薄く伸び続け、ピレノイドが分裂することでデンブン鞘とピレノイドが接する表面積を増加させ、その結果としてピレノイドの個数が増えると考えられている (図 1-2)。以上のよう、ピレノイド周囲に発達するデンブン鞘の CCM における機能については、未だに結論付けられておらず、デンブン鞘の変異株を用いた詳細な解析が必要である。

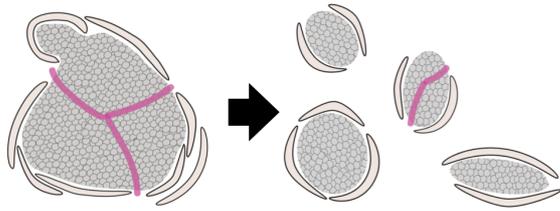


図 1-2. *sagal* 変異株におけるピレノイド形成のモデル (Itakura et al., 2015 より転載)

sagal 変異によりデンブン鞘の伸長が抑制されな
いため、デンブン鞘が薄く伸長する (左)。 *sagal*
変異株ではピレノイドの個数を増やし、デンブン
鞘と接する表面積を増やす (右)。

近年、藻類の CCM を陸上植物へ導入することで光合成を改良し、作物の生産性向上を目指す研究が行われており、 HCO_3^- 輸送体に加えてピレノイドを導入する必要性が議論されている (Lin et al., 2014; Atkinson et al., 2016; Mackinder, 2018; Atkinson et al., 2019)。最近ゲノム配列が解読されたツノゴケ *Anthoceros angustus* において、チラコイド膜ルーメンに局在する α 型炭酸脱水酵素 CAH3 や、ピレノイド周囲に局在し β 型炭酸脱水酵素の活性中心と同様の構造を持つ LCIB と LCIC が保存されていた (Li et al., 2017; Zhang et al., 2020)。

4. 低 CO_2 誘導性タンパク質 LCIB

Low- CO_2 -inducible protein B (LCIB) は、緑藻クラミドモナスで同定され、低 CO_2 条件で誘導される CCM 関連タンパク質として命名された (Miura et al., 2004)。LCIB は緑藻、珪藻、クリプト藻、灰色藻、一部のシアノバクテリアなどの水生光合成生物とツノゴケ、一部のバクテリアに保存されている (Yamano et al., 2010; Jin et al., 2016; Zhang et al., 2020)。LCIB は、そのホモログである LCIC とヘテロダイマーを形成し、6 量体の複合体を形成することが示唆されている (Yamano et al., 2010; Jin et al., 2016)。さらに、クラミドモナスの LCIB と LCIC、珪藻 *Phaeodactylum tricornerutum* の LCIB オルソログの結晶構造が解かれ、これらは β 型炭酸脱水酵素 (CA) の活性部位に特徴的な亜鉛と水を配位する立体構造を持つことが報告された (Jin et al., 2016; Kikutani et al., 2016)。珪藻の 3 つの LCIB ホモログは *in vitro* で CA 活性を示したが、クラミドモナスの LCIB と LCIC は CA 活性を示さなかったことから (Jin et al., 2016)、クラミドモナスの LCIB/LCIC 複合体は細胞内において翻訳後修飾を受けて、機能する可能性が示唆されている。

LCIB が欠損した *lcib* 変異株の特徴的な表現型として、 CO_2 欠乏条件下における生育の違いがある。チャンバー内に通気する空気に含まれる CO_2 濃度を変えて生育させる

と、HC 条件では野生株と同程度の生育速度を示すが、LC 条件では生育が著しく遅延する。しかし、CO₂ 濃度をさらに低い 0.01%の超低 CO₂ (very low-CO₂; VLC) 条件にすると、生育速度は野生株に比べてわずかに遅延するが、LC 条件よりも早く生育する (Duanmu et al., 2009; Yamano et al., 2010; Wang and Spalding 2014a)。このことは、LCIB は特に LC 条件において重要であることを示すと同時に、クラミドモナスが少なくとも 3 段階の CO₂ 濃度 (HC, LC, VLC) に順化する機構を持つことを示唆している。また、*lcib* 変異株の酸素発生速度を測定すると、CO₂ 濃度が約 7 μM 未満では野生株と同様に酸素発生速度が増加するが、CO₂ 濃度が約 7~70 μM では減少し、70 μM 以上では再び増加する二相性のグラフを示す (Yamano et al., 2010; Wang and Spalding, 2014b)。これらの実験から、クラミドモナスが順化できる 3 段階の CO₂ 濃度条件として、超低 CO₂ 条件 (<7 μM)、低 CO₂ 条件 (7~70 μM)、高 CO₂ 条件 (>70 μM) が定義されている (Wang and Spalding, 2014b)。

クラミドモナスの LCIB は、通気する CO₂ 濃度と光に応答して葉緑体全体からピレノイド周囲へと局在を変化させる (Duanmu et al., 2009; Yamano et al., 2010; Wang and Spalding, 2014b; Yamano et al., 2014)。この局在変化が起きる CO₂ 濃度は、液体培地に CO₂ を通気しながら液相培養した場合と、グロースチャンバー内に CO₂ を通気しながら寒天培地上で気相培養した場合とで異なる (Yamano et al., 2010; Wang and Spalding, 2014b)。液体培養条件では、明条件かつ 5% CO₂ 通気条件で LCIB は葉緑体全体に分散し、明条件のまま 0.04% CO₂ 通気条件へ移すとピレノイド周囲へと局在を変化させ、6 時間後には LCIB はリング状に局在を変化させる (図 1-3A,B; Yamano et al., 2010; Yamano et al., 2014)。この状態から細胞を暗条件へ移すと、2 時間後には LCIB は葉緑体全体に分散する (図 1-3C,D)。

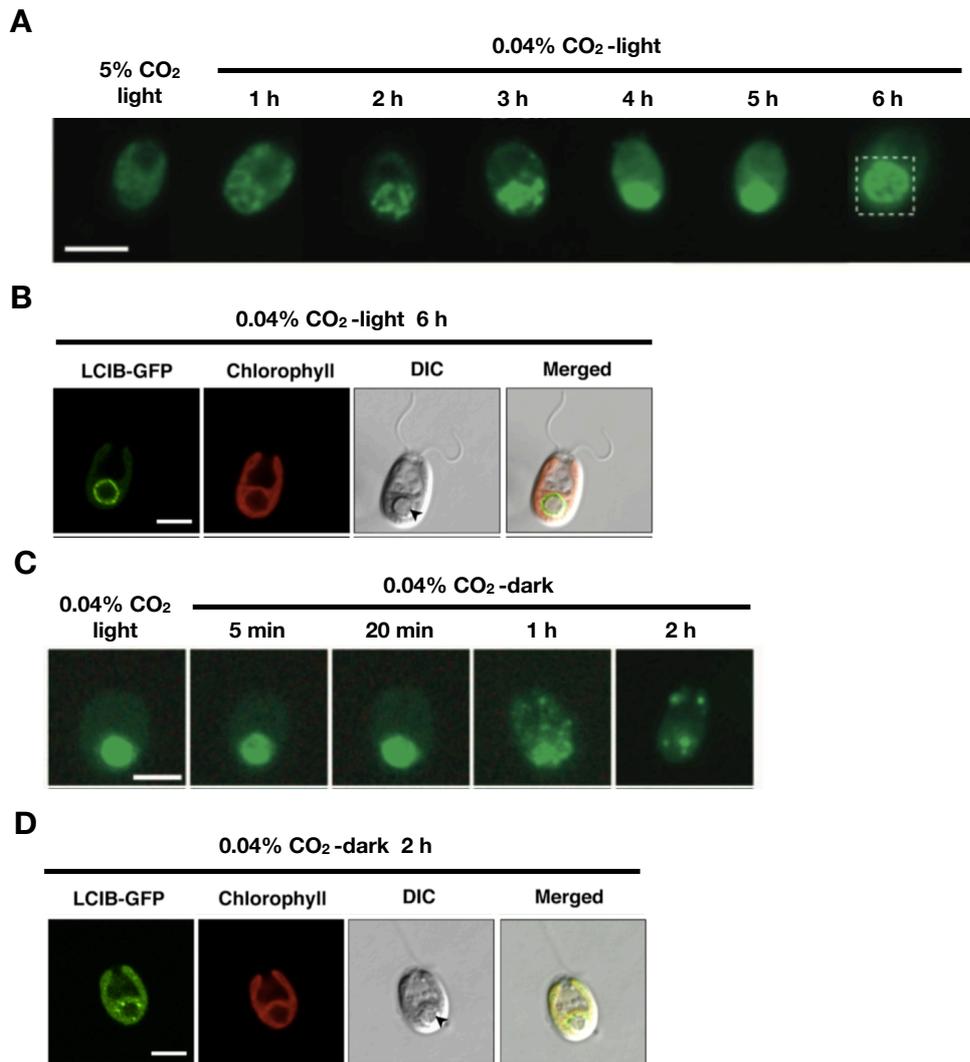


図 1-3. 液体培養時の LCIB の細胞内局在変化 (Yamano et al., 2010; Yamano et al., 2014 を改変)

(A) 明条件において 5% CO₂ 通気条件に順化した細胞を、0.04% CO₂ 通気条件に移したときの LCIB 局在の経時変化を、抗 LCIB 特異抗体を用いた間接的免疫蛍光染色法により観察した。スケールバー：5 μm。

(B) LCIB-GFP を発現する細胞を明条件かつ 0.04% CO₂ 通気 6 時間後に観察した共焦点顕微鏡像。DIC：微分干渉像、スケールバー：5 μm。

(C) 明条件において 0.04% CO₂ 通気条件に順化した細胞を、暗条件に移したときの経時変化を、抗 LCIB 特異抗体を用いた間接的免疫蛍光染色法により観察した。スケールバー：5 μm。

(D) LCIB-GFP を発現する細胞を暗条件かつ 0.04% CO₂ 通気 2 時間後に観察した共焦点顕微鏡像。DIC：微分干渉像、スケールバー：5 μm。

寒天培養条件では、明条件かつ 0.04% CO₂ 通気条件において LCIB は葉緑体全体に分散し、0.01% CO₂ 通気条件において LCIB はピレノイド周囲にリング状に局在する (図 1-4; Wang and Spalding, 2014a)。寒天培養と液体培養で LCIB がピレノイドに局在する CO₂ の通気濃度が異なる理由として以下が考えられる。寒天培養時には、通気した空気が直接細胞に供給されるが、液体培養時には細胞が光合成により培地中の CO₂ を吸収し、通気による CO₂ 供給とのバランスがとれず培地中の実際の CO₂ 濃度が通気した CO₂ 濃度よりもさらに低下している可能性である。しかし、液体培養条件下において LCIB の局在観察と同時に培養液中の溶存 CO₂ 濃度の測定は行われておらず、LCIB の局在変化と実際の溶存 CO₂ 濃度の関係は不明であった。また、暗条件では LCIB が分散することから、LCIB の局在変化が光によっても制御される可能性が議論されてきたが (Yamano et al., 2010)、暗条件では光合成が停止し、培養液中の CO₂ が消費されないため、溶存 CO₂ 濃度が上昇した可能性が残されている。

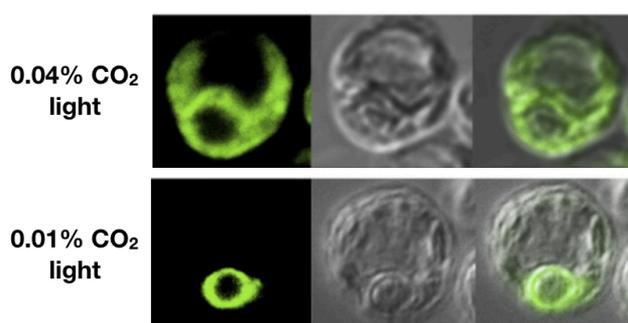


図 1-4. 寒天培養時の LCIB の細胞内局在変化 (Wang et al., 2014a を改変)
抗 LCIB 特異抗体を用いた免疫蛍光染色法による LCIB の細胞内局在。共焦点顕微鏡像を示す。

液体培養条件では、薬剤添加条件における LCIB の局在変化についても観察されている (図 1-5)。明条件かつ 0.04% CO₂ 通気条件に順化した細胞を、5% CO₂ 通気条件に 1 時間移して LCIB を分散させ、光合成電子伝達阻害剤 DCMU を添加して再び 0.04% CO₂ 通気条件に移すと、LCIB の周囲に集合しないことから、LCIB のピレノイド周囲への局在変化に、光合成および CCM の誘導が必要であると考えられた (図 1-5A; Yamano et al., 2010)。しかし、DCMU 添加条件では電子伝達を阻害するため、LCIB の分散は、光合成の停止による培養液中の溶存 C_i 濃度の上昇が原因である可能性がある。さらに、明条件かつ 0.04% CO₂ 通気条件に順化した細胞を、暗条件に 2 時間移して LCIB を分散させ、タンパク質合成阻害剤シクロヘキシミド (CHX) を添加して再び明条件に移すと、

LCIB はピレノイド周囲へ集合しないことから、LCIB のピレノイド周囲への局在変化には、LCIB 自身のタンパク質合成、もしくは明条件に移したときの LCIB 以外の新規タンパク質合成が必要であると考えられていた (図 1-5B; Yamano et al., 2014)。この実験結果の解釈についても、CHX 添加条件では光合成関連タンパク質の合成が停止し、光合成の停止による培養液中の溶存 C_i 濃度が上昇したことが LCIB の分散の原因となった可能性がある。

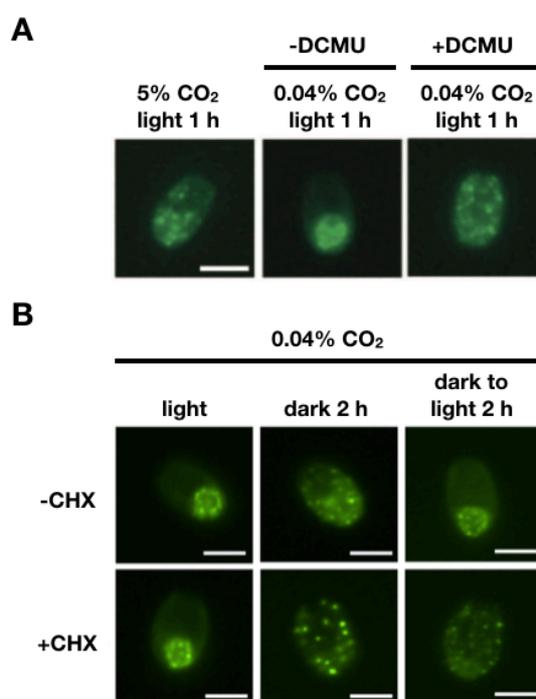


図 1-5. DCMU または CHX 添加条件における LCIB の細胞内局在変化 (Yamano et al., 2010; Yamano et al., 2014 を改変)

(A) DCMU 添加条件における LCIB の局在変化。LCIB-GFP 発現株の蛍光顕微鏡像を示す。明条件において 0.04% CO_2 通気条件に順化した細胞を、5% CO_2 通気条件に 1 時間移して LCIB を分散させた。その後 DCMU を添加 (+DCMU) あるいは添加せず (-DCMU)、0.04% CO_2 通気条件に再び移してから 1 時間後の細胞について観察した。スケールバー：5 μm 。

(B) CHX 添加条件における LCIB の局在変化。LCIB-GFP 発現株の共焦点顕微鏡像を示す。明条件において 0.04% CO_2 通気条件に順化した細胞を、暗条件に 2 時間移して LCIB を分散させた。その後 CHX を添加 (+CHX) あるいは添加せず (-CHX)、明条件に再び移してから 2 時間後の細胞について観察した。スケールバー：5 μm 。

5. CO₂濃度依存的な LCIB の機能モデル

クラミドモナスの CCM は、LCIB/LCIC 複合体の機能および局在変化に注目すると、3つの CO₂ 濃度条件に分けられる。ここでは、LCIB の機能に注目して、これまでの知見をまとめた各 CO₂ 濃度条件における CCM のモデルを示す (図 1-6、図 1-7、図 1-8)。

高 CO₂ 条件 (>70 μM) では、LCIB と LCIC の蓄積レベルは低く、CCM は誘導されずに、CO₂ は拡散により細胞内に流入すると考えられる (図 1-6)。

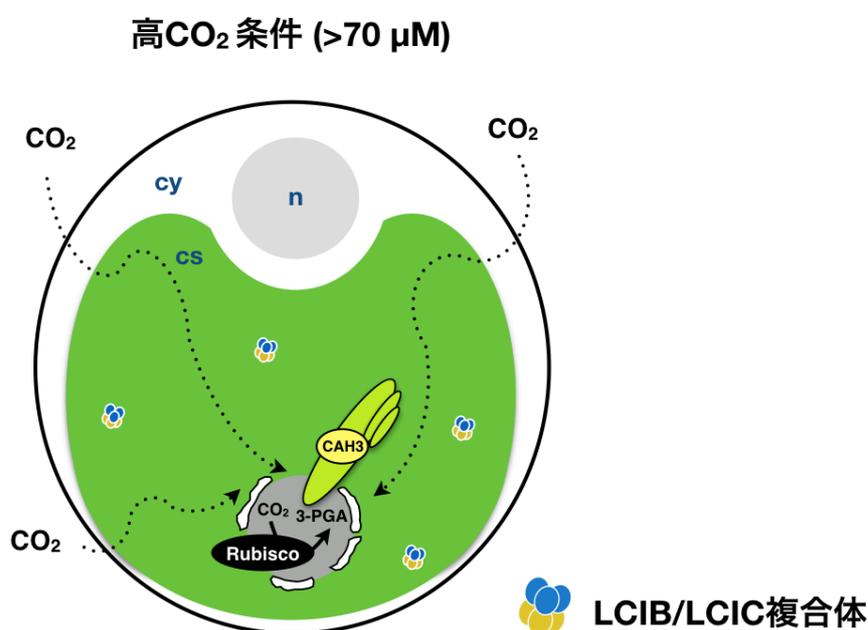


図 1-6. 高 CO₂ 条件における LCIB/LCIC の複合体の働きに注目した CCM モデル (Mackinder et al., 2017 を元に作図)

高 CO₂ 条件では CCM が誘導されないため、ピレノイドは小さく、デンプン鞘の形成はわずかに残っている。LCIB/LCIC 複合体の蓄積レベルは低く、葉緑体全体に分散して存在する。CAH3: α型炭酸脱水酵素、3-PGA: 3-ホスホグリセリン酸。細胞質 (cytosol, cy)、葉緑体ストロマ (chloroplast stroma, cs)、核 (nucleus, n) を示す。

低 CO₂ 条件 (7~70 μM) では、多くの CCM 関連因子の蓄積レベルが上昇し、葉緑体内部にはピレノイドが発達し、デンプン鞘が形成される。LCIB と LCIC の蓄積レベルは上昇するが、LCIB/LCIC 複合体は葉緑体全体に分散したままであり (図 1-4)、葉緑体ストロマへ流入した CO₂ を HCO₃⁻ に変換し Ci プールを形成することで、間接的な CO₂ 取り込みを担うと考えられている (図 1-7)。低 CO₂ 条件ではアニオンチャネル LCIA の蓄積レベルは上昇しているが、その機能は抑制されていると考えられている (Wang and

Spalding, 2014a)。また、ストロマ内の HCO_3^- は、ベストロフィン様タンパク質によってルーメンへと輸送される (Mukherjee et al., 2019)。ルーメンに輸送された HCO_3^- は、再び α 型炭酸脱水酵素の CAH3 によって CO_2 へと変換され、ピレノイド基質の Rubisco へと供給される (Karlsson et al., 1998; Mitra et al., 2005)。

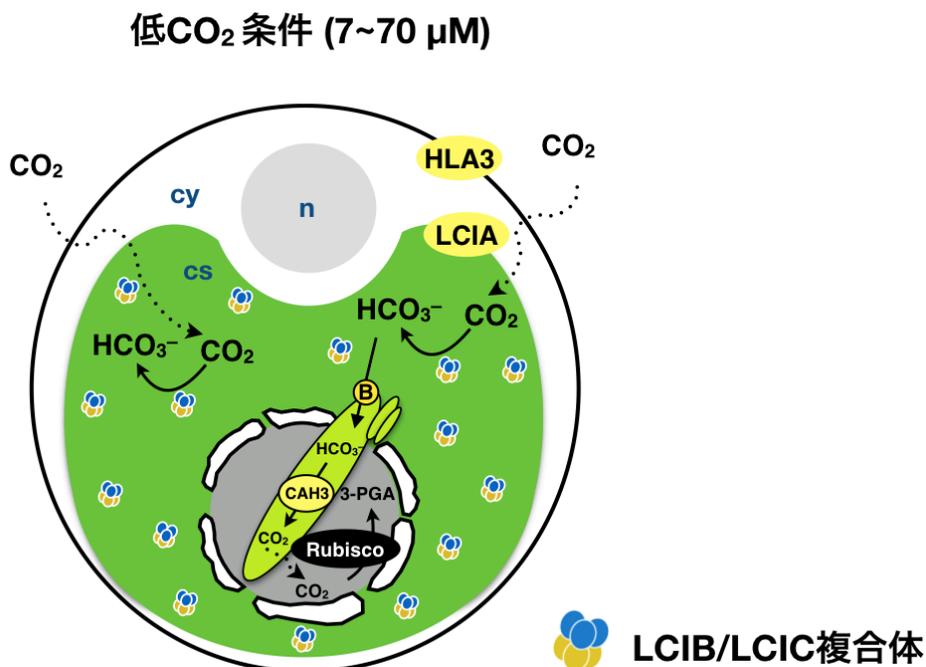


図 1-7. 低 CO_2 条件における LCIB/LCIC の複合体の働きに注目した CCM モデル (Mackinder et al., 2017; Mukherjee et al., 2019 を元に作図)

低 CO_2 条件では CCM が誘導され、ピレノイド構造およびデンブン鞘が発達する。LCIB/LCIC 複合体の蓄積レベルは上昇するが、葉緑体全体に分散して存在する。B: ベストロフィン様タンパク質、HLA3: ABC 輸送体、LCIA: 葉緑体包膜局在型アニオンチャネル、CAH3: α 型炭酸脱水酵素、3-PGA: 3-ホスホグリセリン酸。

超低 CO_2 条件 ($<7 \mu\text{M}$) でも多くの CCM 関連因子の蓄積レベルが上昇し、葉緑体内部にはピレノイドが発達し、デンブン鞘が形成される。超低 CO_2 条件では主に HCO_3^- 輸送体によって、 HCO_3^- が細胞外から葉緑体ストロマへと能動的に取り込まれる (図 1-8)。細胞膜に局在する ABC 輸送体 HLA3 と葉緑体包膜に局在するアニオンチャネル LCIA が協調して、 HCO_3^- を輸送する (Yamano et al., 2015)。ストロマに取り込まれた HCO_3^- は、低 CO_2 条件と同様にピレノイドへと輸送される。超低 CO_2 条件では、葉緑体全体に分散していた LCIB/LCIC 複合体はピレノイド周囲へと局在を変化させることから、LCIB/LCIC 複合体はピレノイドから漏れ出た CO_2 を HCO_3^- へ再変換すると考えられて

いる (Yamano et al., 2010)。また、LCIB/LCIC 複合体はピレノイド周囲のチラコイド膜に局在するベストロフィン様タンパク質と相互作用することが示唆されている (Mackinder et al., 2017)。ベストロフィンはバクテリアから哺乳類まで全ての生物群で保存されているアニオンチャンネルであり (Johnson et al., 2017)、ヒトのベストロフィンでは HCO_3^- を輸送することが報告されている (Qu and Hartzell, 2008; Yu et al., 2008)。クラミドモナスでは、LCIB/LCIC 複合体によって変換された HCO_3^- は、ベストロフィン様タンパク質によって再びチラコイドルーメンへと輸送されることで、 CO_2 がリサイクルされると考えられている (Mukherjee et al., 2019)。さらに、抗 LCIB 抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察により、LCIB がデンブンプ鞘の外側に不連続な塊の形状で局在することが報告されており、チラコイド膜が貫入するデンブンプ鞘の隙間近くに、LCIB が多く局在することが示唆されている (図 1-8; Yamano et al., 2010)。

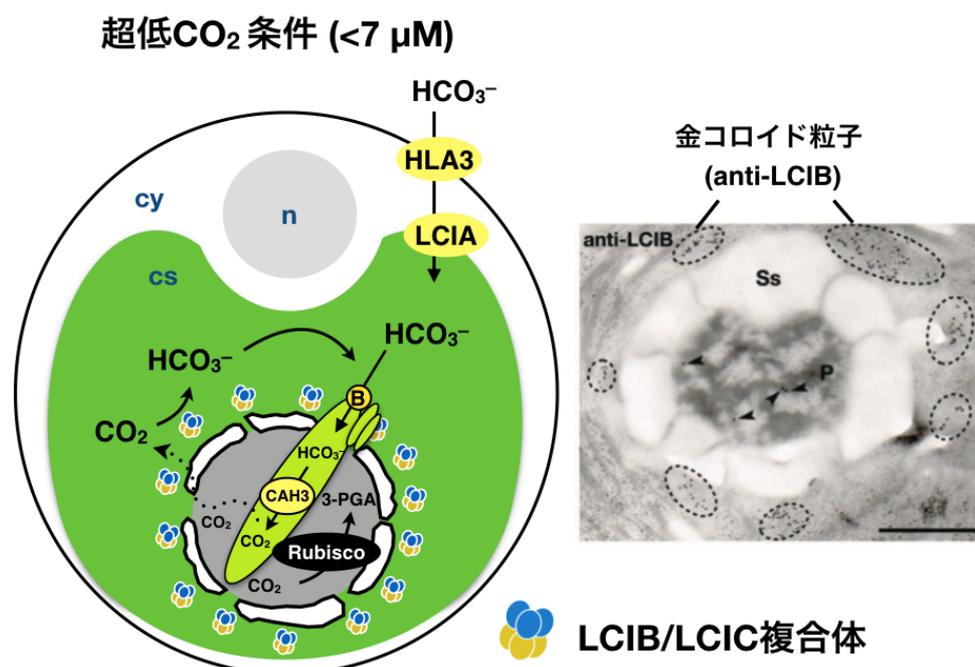


図 1-8. 超低 CO_2 条件における LCIB/LCIC の複合体の働きに注目した CCM モデル (Mackinder et al., 2017; Mukherjee et al., 2019 を元に作図)

超低 CO_2 条件では CCM が誘導され、ピレノイド構造およびデンブンプ鞘が発達する。LCIB/LCIC 複合体の蓄積レベルは低 CO_2 条件と同様に上昇するが、ピレノイド周囲にリング状に局在する。B: ベストロフィン様タンパク質、HLA3: ABC 輸送体、LCIA: 葉緑体包膜局在型アニオンチャンネル、CAH3: α 型炭酸脱水酵素、3-PGA: 3-ホスホグリセリン酸。右側は抗 LCIB 特異抗体を用いた免疫電子顕微鏡像を示す。点線の円および矢尻は金コロイド粒子の存在を示す。Ss: デンブンプ鞘、P: ピレノイド、スケールバー: 1 μm 。

以上のように、CO₂環境に応じた Rubisco の基質となる CO₂ 輸送経路が明らかになってきたが、CCM において重要な役割を担う LCIB が局在を変化させる詳細な環境条件は不明であった。また、LCIB がピレノイド周囲に局在化するために必要な因子についても知られていない。過去に、クラミドモナスの野生株へ LCIB-GFP を発現させた株を用いてタグ挿入変異を行ない、LCIB 局在異常株が 12 株単離されているが、原因遺伝子の同定には至っていない (Yamano et al., 2014)。

6. デンプン枝切り酵素イソアミラーゼ 1

光合成によって蓄積されるデンプンは、分岐構造をもった主成分のアミロペクチンと、主として直鎖からなるアミロースの 2 種類によって構成される。植物におけるデンプンの生合成は少なくとも、下記の 4 種類の酵素によって行われる。(1) 光合成産物であるグルコース 1-リン酸から ADP-グルコースを生産する ADP-グルコースピロフォスホリラーゼ、(2) ADP-グルコースを基質として α -1,4 グルコシド結合を伸長し直鎖化を促進するデンプン合成酵素、(3) α -1,6 グルコシド結合を形成するデンプン分岐酵素、(4) デンプン枝切り酵素はアミロペクチンの規則的なクラスター構造を形成するために必要な、 α -1,6 グルコシド結合を切断するデンプン枝切り酵素である。

クラミドモナスのデンプン合成に関与する因子を明らかにするため、デンプンの蓄積が減少あるいは欠損したデンプン合成変異株 (starch-less mutant; *sta* 変異株) が複数単離されており (Ball et al., 1991)、*sta* 変異株のうち 9 株について変異原因遺伝子が同定されている (表 1-1)。その中でも、デンプンをほとんど蓄積しない *sta7* 株の変異原因遺伝子として、デンプン枝切り酵素の Isoamylase1 (ISA1) が同定されており、*sta7* 株は、デンプンの代わりに少量のフィトグリコーゲンを蓄積する (Mouille et al., 1996)。フィトグリコーゲン (図 1-9A) はアミロペクチン (図 1-9B) の前駆体であり、分岐数が多く可溶性を示す。*sta7* 株ではデンプン粒を蓄積しないことが電子顕微鏡像によっても示されている (Mouille et al., 1996)。

表 1-1. クラミドモナスにおける代表的なデンプン合成変異株
(The Chlamydomonas sourcebook, second edition, volume1 を改変)

変異株	遺伝子名	概要	デンプン鞘 TEM 観察像	文献
<i>sta1</i>	<i>STA1</i>	ADP-グルコースピロフォスホリラーゼの大サブユニットの変異株。デンプンはほとんど蓄積できない。	デンプン鞘を形成しない。	Ball et al., 1991; van den Koornhuysse et al., 1996; Zabawinski et al., 2001
<i>sta2</i>	<i>STA2</i>	顆粒結合型デンプン合成酵素の変異株。アミロース蓄積が欠損し、修飾アミロペクチンを蓄積する。"waxy" 表現型を示す。	野生株と比べて薄いデンプン鞘を形成する。	Delrue et al., 1992; Maddelein et al., 1994; Wattebled et al., 2002; Izumo et al., 2011
<i>sta3</i>	<i>STA3</i>	可溶性デンプン合成酵素の変異株。低アミロペクチン、高アミロース蓄積の表現型を示す。	N.D.	Maddelein et al., 1994; Buleón et al., 1997; Ral et al., 2006
<i>sta4</i>	<i>PHOB</i>	デンプンホスホリラーゼの変異株。デンプン蓄積が 60%減少する。	N.D.	Libessart et al., 1995; Ral et al., 2006
<i>sta5</i>	<i>GPM1</i>	ホスホグルコムターゼの変異株。デンプン蓄積が大幅に減少し、アミロースをわずかに蓄積する。	N.D.	van den Koornhuysse et al., 1996
<i>sta6</i>	<i>STA6</i>	ADP-グルコースピロフォスホリラーゼの小サブユニットの変異株。デンプン蓄積は欠損する。	N.D.	Ball et al., 1991; Iglesias et al., 1994; van den Koornhuysse et al., 1996; Zabawinski et al., 2001
<i>sta7</i>	<i>ISA1</i>	デンプン枝切り酵素イソアミラーゼ 1 の変異株。デンプンの代わりにわずかにフィトグリコーゲンを蓄積する。	デンプン鞘を形成しない。	Mouille et al., 1996; Ramazanov et al., 1994; Dauvillée et al., 1999; Dauvillée et al., 2001a; Posewitz et al., 2004
<i>sta8</i>	<i>ISA2</i>	デンプン枝切り酵素イソアミラーゼ 2 の変異株。アミロースとフィトグリコーゲンを蓄積する。	N.D.	Dauvillée et al., 2001a; Dauvillée et al., 2001b; Ral et al., 2006; Sim et al., 2014
<i>sta11</i>	<i>DPE1</i>	α -1,4 グルカノトランスフェラーゼの変異株。デンプンの蓄積が 90% と大幅に減少し、枝分かれの無いマルチオリゴ糖を蓄積する。	N.D.	Colleoni et al., 1999a; Colleoni et al., 1999b; Wattebled et al., 2003

N.D.は未決定 (not determined) を示している。

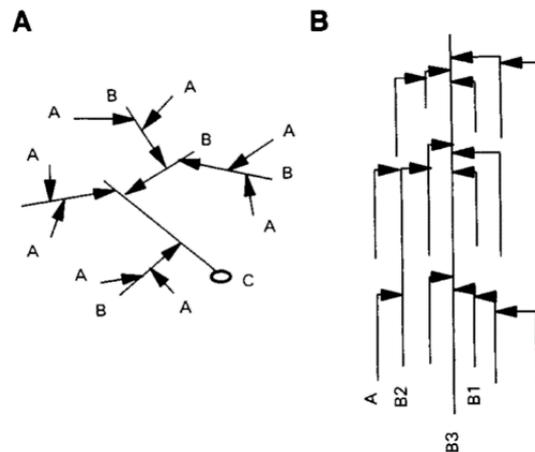


図 1-9. アミロペクチンおよびフィトグリコーゲンの一次構造 (Mouille et al., 1996 を転載)

(A) フィトグリコーゲンの一次構造。A 鎖は α -1,6 結合によって連結された部位であるが、他の A 鎖または B 鎖の分岐が認められない。B 鎖は α -1,6 結合によって連結された部位で、少なくとも 1 つ以上の A 鎖または B 鎖の分岐が認められる。C 鎖は還元末端部を示す。

(B) アミロペクチンの一次構造。3 つのユニットを示す。ほとんど全ての鎖に分岐が認められ、(A)とは大きくことなる。B1 鎖、B2 鎖、B3 鎖は、それぞれ長さに応じて呼び分けられる。

目的

緑藻の CO₂ 濃縮機構に必須な因子 LCIB は、通気する CO₂ 濃度と光に応答して葉緑体全体からピレノイド周囲へと局在変化するが、そのピレノイドへの局在化に必要な因子は明らかにされていなかった。さらに、ピレノイド周囲に形成するデンブン鞘の CCM における重要性はこれまで明確ではなかった。本研究では、LCIB がピレノイド周囲に局在化するために必要な環境条件ならびに新規因子を明らかにすることを目的とした。

結果

1. 葉緑体における溶存 CO₂ 濃度依存的な LCIB の局在変化

葉緑体内における LCIB の局在変化に無機炭素 (Ci) 濃度と光照射がどのように関わるのかを明らかにするために、異なる CO₂ 濃度の通気条件および光照射条件下で、培地中の溶存 Ci 濃度を測定しながら LCIB の局在変化を観察した。はじめに、LCIB の局在を細胞内で可視化するため、LCIB に改変型 GFP タンパク質をコードする *Clover* を連結した発現プラスミドを *LCIB* 欠損株へ形質転換して LCIB-Clover 発現株を単離し、*lcib* 変異株の表現型が相補した株を以下のように作出した。

クラミドモナス挿入変異株ライブラリー (Li et al., 2016) から、パロモマイシンに耐性を付与する *aphVIII* 遺伝子カセットが *LCIB* (*Cre10.g452800*) の遺伝子配列に挿入された挿入変異株 (LMJ.RY0402.173287) を取り寄せ、B1 株と名付けた。B1 株における *aphVIII* の挿入部位を確認するために、*LCIB* の遺伝子配列の一部を増幅するプライマーセット LCIB-F2/LCIB-R3 を用いてゲノミック PCR を行なった (図 2-1A, B)。

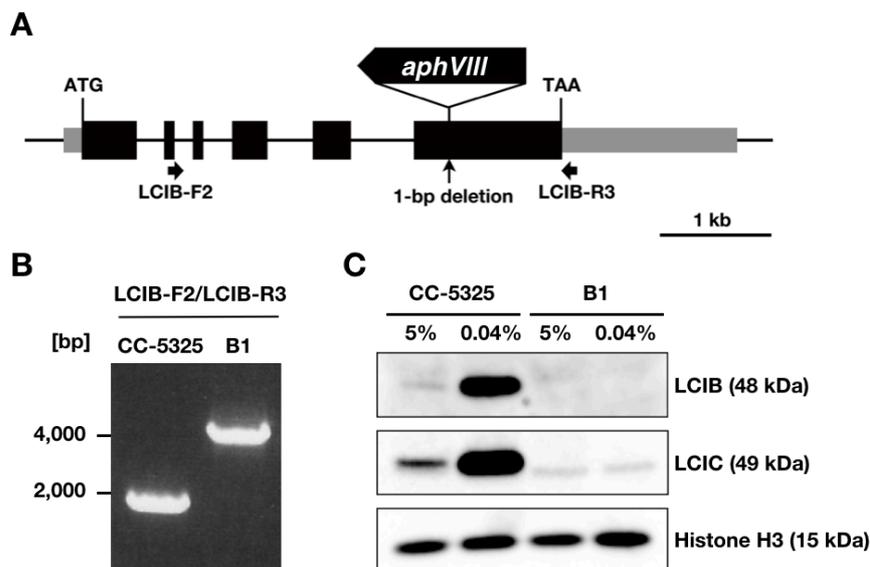


図 2-1. LCIB 挿入変異株 (B1) の解析

(A) B1 株における *aphVIII* カセットの挿入箇所。黒い四角はエキソン、黒線はイントロン、灰色の四角は非翻訳領域を示す。太矢印は PCR に用いたプライマーを示す。ATG はスタートコドン、TAA はストップコドンを示す。

(B) B1 株における *aphVIII* カセットの挿入を調べるための PCR の電気泳動写真。B1 株の親株 (CC-5325) をコントロールに用いた。bp は塩基対を示す。

(C) ウェスタンブロット解析による CC-5325 株と B1 株の LCIB および LCIC タンパク質の蓄積量。連続白色光を照射しながら 5% CO₂ 通気条件で培養した細胞を、光条件を変えずに 5% または 0.04% CO₂ 通気条件に移して 12 時間後の細胞からタンパク質を抽出した。Histone はローディングコントロールに用いた。

親株の CC-5325 では 1,867 bp のバンドが検出されたが、B1 株では約 2,200 bp のバンドシフトが起こり、約 4,000 bp のバンドが検出された (図 2-1B)。このバンドシフトのサイズは *aphVIII* カセットのサイズ (2,223 bp) とほぼ一致したことから、B1 株では *LCIB* に 1 コピーの *aphVIII* が挿入されていることが示唆された。

次に、*aphVIII* の挿入部位の配列を調べたところ、*LCIB* の第 6 エキソンに *LCIB* 遺伝子配列の 1 bp の欠損を伴って *aphVIII* が *LCIB* の転写方向とは逆向きに挿入されていた (図 2-1A)。さらに、CC-5325 株では 0.04% CO₂ 通気条件下で *LCIB* (48 kDa) とその相互作用因子である *LCIC* (49 kDa) の蓄積レベルが増大するのに対して、B1 株では *LCIB* の蓄積が消失した。*LCIC* の蓄積レベルも低下したことから、B1 株が *LCIB* 欠損株であると判定した (図 2-1C)。

B1 株は、野生株と比べて細胞当たりのクロロフィル量が低い、細胞サイズが小さい、また試験管に付着する表現型を示したことから、B1 株を野生株と 2 回交配し、*lcib* 変異以外の形質を野生株に近づけた子株を単離した (図 2-2A)。はじめに、B1 株 (*mt*⁻; 雄株) を野生株 CC-1690 (*mt*⁺; 雌株) と交配し、F₁ 株 73-4 (*lcib*, *mt*⁺) を取得した。さらに、73-4 株を野生株 C9 (*mt*⁻) と交配し、F₂ 株 (*lcib*) を取得した。F₂ 株のうち、細胞の大きさと細胞当たりのクロロフィル量が C9 株と同程度であり、試験管に付着しない性質を持つ 99-4 株 (*lcib*, *mt*⁺) を *lcib* 変異株として今後の解析に使用した (表 2-1)。*LCIB* の局在を *in vivo* で可視化するため、Clover の発現プラスミド pOpt_Clover_Hyg (Lauersen et al., 2014) に *LCIB* の遺伝子配列をクローニングした *LCIB*-Clover 発現コンストラクト pCT1 を作出し、エレクトロポレーション法により 99-4 株へ形質転換した (図 2-2B)。このとき、高 CO₂ 条件においても *LCIB* の局在を観察するために、*LCIB*-Clover の発現には恒常発現プロモーターを使用した。得られた形質転換株の中から、最も蛍光輝度の高い株 (MBC-3 株) を解析に用いた。ウェスタンブロット解析の結果から、99-4 株は *LCIB* と *LCIC* を蓄積しなかったが、MBC-3 株は *LCIB*-Clover 融合タンパク質の蓄積に伴って *LCIC* の蓄積が回復した (図 2-2C)。*LCIB*-Clover が細胞内で機能的であるかどうかを調べるため、C9 株、99-4 株、MBC-3 株のスポットテストによる生育判定と光合成の酸素発生速度の測定を行なった。高 CO₂ 条件 (5% CO₂) では、いずれの株においても生育速度に差は無かったが、低 CO₂ 条件 (0.04% CO₂) では、99-4 株の

生育が顕著に遅延し、超低 CO₂ 条件 (<0.01% CO₂) においてもわずかに遅延した (図 2-2D)。一方、MBC-3 株では、低 CO₂ 条件と超低 CO₂ 条件における生育が C9 株と同程度に回復した。

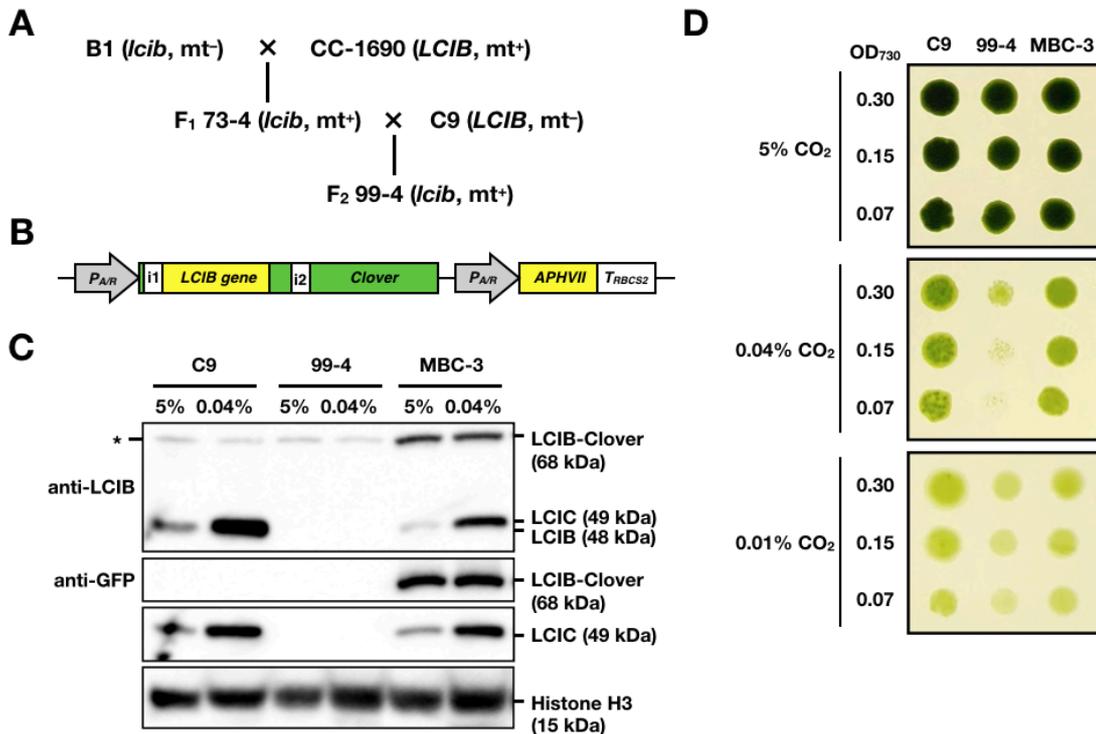


図 2-2. *lcib* 変異株 99-4 と LCIB-Clover 発現株 MBC-3 の表現型解析

(A) B1 株と野生株の交配による F₂ 株 99-4 の作出過程。CC-1690 株と C9 株はそれぞれ雌株 (*mt*⁺)、雄株 (*mt*⁻) の野生株。×は掛け合わせを、縦棒は掛け合わせによって生じた子株を示す。

(B) LCIB-Clover 発現コンストラクト pCT1 の構造。P_{A/R} : 遺伝子の恒常発現に寄与する *HSP70A/RBCS2* タンデムプロモーター、T_{RBCS2} : *RBCS2* の 3'-UTR、i1 : *RBCS2* の 1st イントロン、i2 : *RBCS2* 遺伝子の 2nd イントロン。APHVII : ハイグロマイシンに対して耐性を付与する遺伝子。

(C) ウェスタンブロット解析による C9、99-4、MBC-3 株における LCIB、LCIC、LCIB-Clover の蓄積。連続白色光を照射しながら 5% CO₂ 通気条件で培養した細胞を、光条件は変えずに 5% または 0.04% CO₂ 通気条件に移して 12 時間後の培養液からタンパク質を抽出した。抗 LCIB 特異抗体を用いたとき、交差反応により内在性の LCIC も検出された。*は抗 LCIB 特異抗体を用いたときに C9 株と 99-4 株で検出された非特異的バンドを示すが、その位置は MBC-3 株のみ検出された LCIB-Clover のサイズと被っている。LCIC の検出には抗 LCIC 特異抗体を用いた。Histone H3 はローディングコントロールに用いた。

(D) 生育判定のためのスポットテスト。OD₇₃₀ を 0.30、0.15、0.07 に合わせた細胞懸濁液 3 μL を、炭素源を含まない寒天培地に滴下し、連続白色光を 120 μmol photons m⁻² s⁻¹ の光強度で照射しながら高 CO₂ (5%) 条件、低 CO₂ (0.04%) 条件、超低 CO₂ (0.01%) 条件でそれぞれ 4、5、6 日間培養し、写真撮影した。

表 2-1. *lcib* 変異株の F₂ 子株の表現型

株名	試験管への 付着性	細胞粒径 [μm]	クロロフィル量 [pg/cell]
C9	–	6.56	1.32
21-1	–	6.07	0.75
28-1	–	6.14	0.92
35-2	–	6.20	0.87
72-1	+	6.73	1.43
99-4	–	6.94	1.31

lcib 変異株の F₁ 子株と C9 株を交配して得られた F₂ 子株について、通気培養時の試験管への付着の性質 (+: 付着性あり、–: 付着性なし)、細胞粒径測定、細胞当たりのクロロフィル量を比較した。

次に、99-4 株と MBC-3 株の酸素発生速度を測定することで CCM を評価した。光合成における無機炭素 (Ci) への親和性は、最大酸素発生速度 (V_{max}) の半分の値を与える Ci 濃度である $K_{0.5}$ (Ci) 値によって示すことができる。 $K_{0.5}$ (Ci) 値が小さいほど細胞の Ci への親和性が高いことを示す。0.04% CO₂ 通気条件に順化した C9 株および MBC-3 株の $K_{0.5}$ (Ci) 値は、5% CO₂ 通気条件に順化したときより顕著に低い値を示したが、99-4 株では二相性のグラフを示したため (図 2-3A)、 $K_{0.5}$ (Ci) 値が決定できなかった (表 2-2; 図 2-3C)。酸素発生速度と CO₂ 濃度との関係性を調べるために、Ci 濃度を CO₂ 濃度に換算した酸素発生速度のプロット図を作成したところ、99-4 株における二相性のグラフは、CO₂ 濃度が約 7 μM 以下では野生株と同様に上昇するが、約 7~100 μM では低下し、約 100 μM 以上で再び上昇した (図 2-3B)。また、99-4 株では 5% および 0.04% CO₂ 通気条件に順化した細胞の両方で V_{max} 値が C9 株及び MBC-3 株の 64~78% に低下した (表 2-2; 図 2-3C)。さらに、 $K_{0.5}$ (Ci) 値は 5% 通気条件に順化した細胞でも野生株及び MBC-3 株の約 5 倍に増加し (表 2-2; 図 2-3C)、Ci への親和性の低下が認められた。これは、過去に報告された *LCIB* ノックダウン株や *LCIB* 欠損株に特徴的な表現型と一致した (Yamano et al., 2010; Wang and Spalding, 2014b)。一方、MBC-3 株では C9 株と同程度に酸素発生速度が回復した。これらの結果から、MBC-3 株において *LCIB*-Clover 融合タンパク質が細胞内で機能的であることが示された。

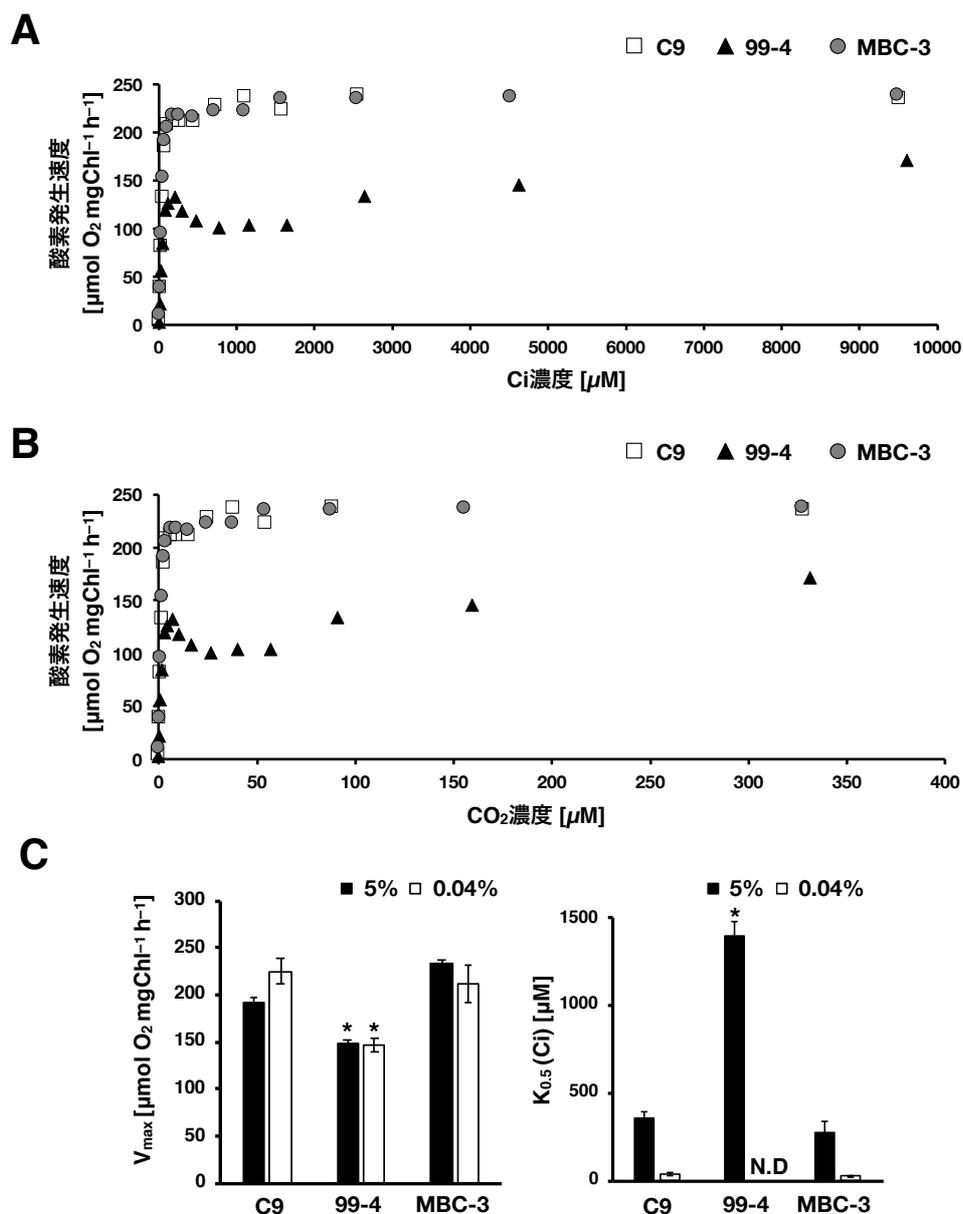


図 2-3. *lcib* 変異株 99-4 と LCIB-Clover 発現株 MBC-3 の酸素発生速度

(A) C9、99-4、MBC-3 株の酸素発生速度のプロット図。細胞内の C_i を枯渇させた状態から、 NaHCO_3 を $10 \mu\text{M}$ 濃度から徐々に加えた時の酸素発生速度 (Y 軸) と溶存 C_i 濃度 (X 軸) をプロットした。実験は独立した 3 回以上の測定を行い、典型的な測定値を示した。

(B) C9、99-4、MBC-3 株の酸素発生速度について、(A) の C_i 濃度を CO_2 濃度に換算したプロット図。酸素発生速度 (Y 軸) と溶存 CO_2 濃度 (X 軸) をプロットした。

(C) 光合成における最大酸素発生速度 (左) と $K_{0.5}(\text{C}_i)$ 値 (右)。(A) で示すように、細胞に加えた溶存 C_i 濃度に対する酸素発生速度を測定し、最大酸素発生速度 (V_{max}) とその半分の値を示す C_i 濃度である $K_{0.5}(\text{C}_i)$ 値を算出した。連続白色光を照射しながら 5% CO_2 通気条件で培養した細胞を、光条件を変えずに 5% または 0.04% CO_2 通気条件に移してから 12 時間後に用いた。測定バッファーには溶存 C_i を枯渇させた HEPES 緩衝液 (pH=7.8) を用いた。独立した 3 回以上の実験の平均値とその標準偏差を示し、Student's *t*-test により異なる条件間の統計的有意差を評価した。* : P 値 < 0.01 を示す。N.D. : 未決定 (not determined)。99-4 株は二相性のグラフを示したため、 $K_{0.5}(\text{C}_i)$ 値が一意に決まらないことを示す。

表 2-2. pH 7.8 での最大酸素発生速度および Ci 親和性

株名	生育条件	V_{max} [$\mu\text{mol O}_2 \text{ mgChl}^{-1} \text{ h}^{-1}$]	$K_{0.5}(\text{Ci})$ [μM]
C9	5% CO ₂ 24 時間	191 ± 5.9	364 ± 32
	0.04% CO ₂ 12 時間	225 ± 14	43 ± 7.7
99-4	5% CO ₂ 24 時間	149 ± 3.9	1393 ± 85
	0.04% CO ₂ 12 時間	147 ± 7.3	N.D.
MBC-3	5% CO ₂ 24 時間	233 ± 4.8	281 ± 62
	0.04% CO ₂ 12 時間	211 ± 20	29 ± 3.1

図 2-3. における最大酸素発生速度と Ci 親和性を示す。5% CO₂ 通気条件に 24 時間以上順化させた細胞と、その後 0.04% CO₂ 通気条件に移してから 12 時間後の細胞を用いた。HEPES 緩衝液 (pH=7.8) を用いて測定した。実験は独立した 3 回以上の実験の平均値とその標準偏差を示す。N.D.: 未決定 (not determined)。

水中で、CO₂ は水分子と反応して HCO₃⁻ との平衡状態に達する。図 2-4 に示すように、pH が上昇するに従って HCO₃⁻ の割合が増加し、CO₂ の割合は低下する。ある pH における溶存 HCO₃⁻ 濃度 ([HCO₃⁻]) と溶存濃度 CO₂ ([CO₂]) の比 ([HCO₃⁻]/[CO₂]) は、ヘンダーソン・ハッセルバルヒの式

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log_{10}([\text{HCO}_3^-]/[\text{CO}_2])$$

を用いて算出することができる。ここで pKa は炭酸の第一段階目の解離定数 pKa=6.35 である。この式に従って、pH 7.0、7.4、7.9、8.4 条件における、[HCO₃⁻]/[CO₂] をそれぞれ算出した (表 2-3)。

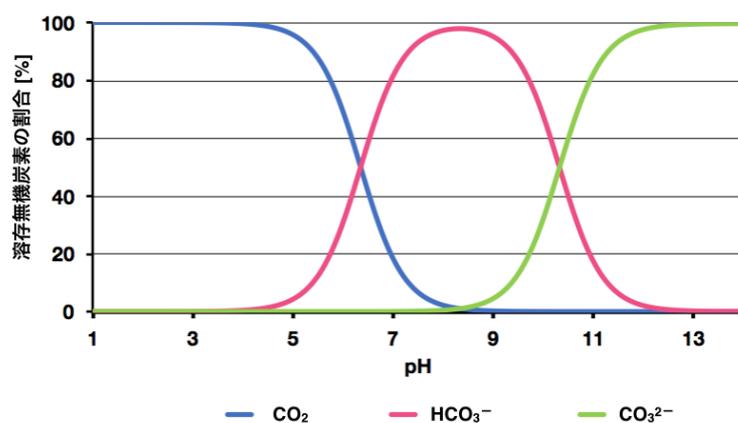


表 2-3. 各 pH 条件における溶存 Ci 比率

pH 条件	[HCO ₃ ⁻]/[CO ₂]
pH 7.0	4.46
pH 7.4	11.22
pH 7.9	35.48
pH 8.4	112.2

図 2-4. pH 依存的な溶存 Ci の平衡状態

全溶存無機炭素濃度を 100%とした時の CO₂ 濃度の割合 (青) HCO₃⁻濃度の割合 (ピンク)、CO₃²⁻濃度の割合 (黄緑)。

培地に通気する CO₂ 濃度の変化に伴って生じる LCIB の局在変化が、溶存 Ci 濃度 ([Ci]) のうち [CO₂] および [HCO₃⁻] のどちらに依存するのかについて調べるために、培地の pH を変えることで [HCO₃⁻]/[CO₂] を変化させた条件で MBC-3 株における LCIB の局在変化を観察した。また、局在観察と同時に、ガスクロマトグラフィ (GC) を用いて培養液から細胞を除いた培地中の Ci 濃度を測定した (図 2-5A)。さらに、得られた画像から葉緑体内における LCIB-Clover 蛍光シグナルの変動係数 (coefficient of variation; CV) の値を算出し、細胞集団における LCIB の細胞内の局在パターンを定量化した (図 2-5B)。CV 値が高いときは蛍光シグナルが細胞内で偏っていることを、CV 値が低いときは蛍光シグナルが細胞内で分散していることをそれぞれ示している (Nitta et al., 2018)。pH 7.0 条件において明条件かつ 0.04% CO₂ 通気 (コントロール培養条件) により CCM を誘導した細胞を、それぞれ pH 7.0、pH 7.4、pH 7.9、pH 8.4 の培地に移し、光条件を変えずに CO₂ 濃度を高めた 0.12% CO₂ を通気してから 3 時間後の細胞について、LCIB の局在変化を観察した。

pH 7.0 のコントロール培養条件における細胞溶液中の Ci 濃度は $16 \pm 4.2 \mu\text{M}$ 、HCO₃⁻ 濃度は $13 \pm 3.4 \mu\text{M}$ 、CO₂ 濃度は序論で示した超低 CO₂ 条件に相当する $2.9 \pm 0.2 \mu\text{M}$ と算出され、LCIB はピレノイド周囲にリング状に局在した (図 2-5A)。明条件かつ 0.12% CO₂ 通気条件に移した pH 7.0 の細胞溶液では、Ci 濃度、HCO₃⁻ 濃度、CO₂ 濃度はそれぞれ上昇し、LCIB-Clover は葉緑体中に分散した (図 2-5A)。同様に、明条件かつ 0.12% CO₂ 通気条件のまま pH を pH 7.0 から pH 8.4 まで上昇させると、Ci 濃度と HCO₃⁻ 濃度は上昇したが、CO₂ 濃度は低下し、LCIB-Clover はピレノイド周囲へと集合した (図 2-5A)。pH 7.4 と pH 7.9 では CO₂ 濃度は低 CO₂ 条件に相当する約 $10 \mu\text{M}$ 付近を維持し、LCIB-Clover 蛍光の CV 値が高い細胞と低い細胞が混在していたが (図 2-5A,B)、pH 8.4 では CO₂ 濃度は超低 CO₂ 条件に相当する $6.5 \pm 2.2 \mu\text{M}$ に低下し、CV 値は上昇し、ほとんどの細胞において LCIB-Clover はピレノイド周囲にリング状に集合した (図 2-5A,B)。

以上の結果から、LCIB のピレノイド周囲への局在変化は、培地中の溶存 HCO₃⁻ 濃度ではなく溶存 CO₂ 濃度の低下に依存することが明らかとなった。また、LCIB の分散とリング状の局在が切り替わる溶存 CO₂ 濃度は、LCIB の機能によって定義された低 CO₂ 条件と超低 CO₂ 条件の境界に相当する約 $7 \mu\text{M}$ (Wang and Spalding, 2014a) とほぼ一致

することが明らかになった。以後は、LCIB の局在変化についても $7\mu\text{M}$ 以下の溶存 CO_2 濃度を超低 CO_2 条件と定義する。

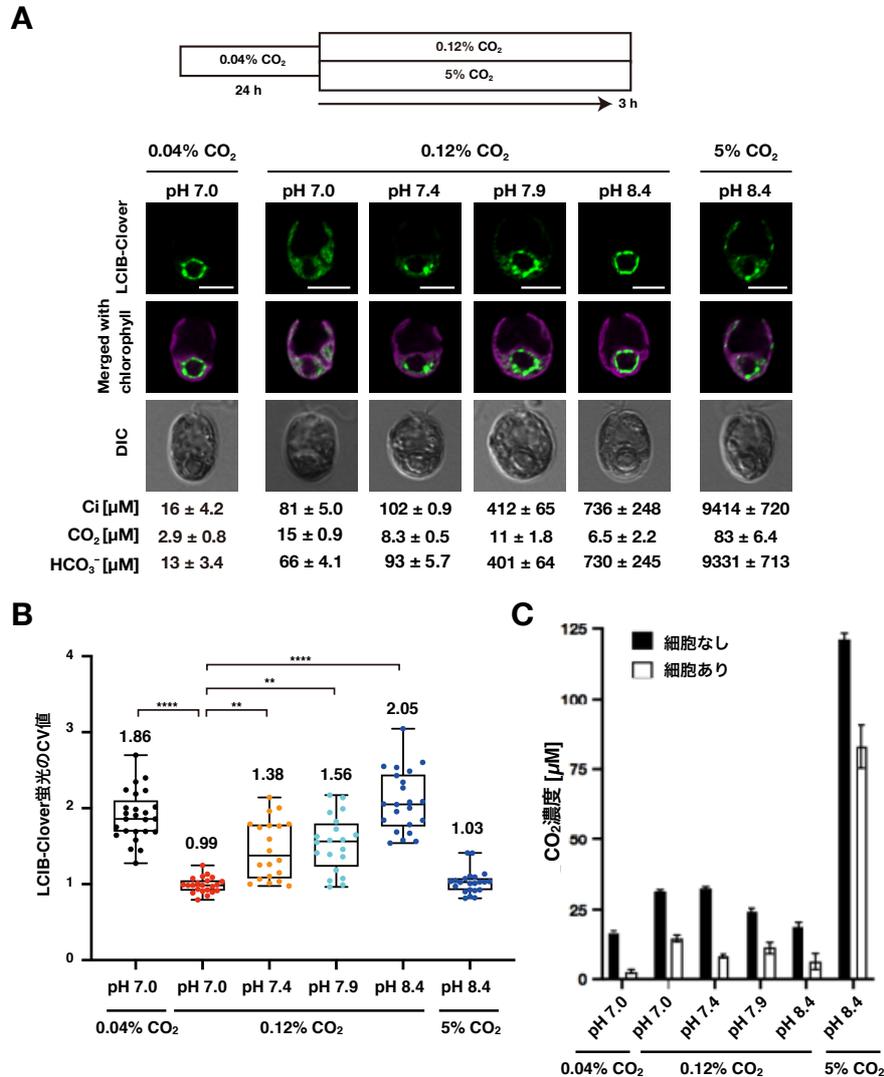


図 2-5. 異なる pH 条件下の MBC-3 株における LCIB の細胞内局在と溶存無機炭素濃度

(A) 異なる pH 条件下における代表的な LCIB-Clover 蛍光観察像。緑色は LCIB-Clover に由来する蛍光、マゼンタ色はクロロフィルに由来する自家蛍光を示し、中段にその重ね合わせ像を示す。連続白色光を照射しながら 0.04% CO_2 通気条件（培地の pH は 7.0）で 24 時間培養した MBC-3 株の細胞を、光条件を変えずに 0.12% 通気条件（培地の pH は 7.0, 7.4, 7.9, 8.4）または 5% CO_2 通気条件（培地の pH は 8.4）に移して 3 時間後の細胞について、LCIB 蛍光シグナルの局在変化を観察した。細胞培養液中の全無機炭素濃度（Ci: $\text{HCO}_3^- + \text{CO}_2$ ）、 CO_2 濃度、 HCO_3^- 濃度を、それぞれの画像の下に示した。DIC: 微分干渉像、スケールバー: $5\mu\text{m}$ 。

(B) 異なる pH 条件下における LCIB-Clover 蛍光の局在パターンの定量化。LCIB-Clover の局在を定量化するため、それぞれの細胞における LCIB-Clover 蛍光強度の変動係数（CV 値）を算出した。グラフ中の数値は、CV 値の中央値を示す。CV 値は中央値と四分位範囲を示すエラーバーによって表す ($n=20\sim 22$)。Kruskal-Wallis 法による分散分析を行った後、Dunn 法による多重比較検定を行い、pH 7.0 条件かつ 0.12% CO_2 通気条件と異なる条件間の統計的有意差を評価した。** P 値 < 0.01 ; **** P 値 < 0.0001 。

(C) 異なる pH 条件下における細胞培養液または培地中の溶存 CO_2 濃度。細胞なし: 各々の pH に合わせた培地に 0.12% または 5% CO_2 を通気した際の CO_2 濃度。細胞あり: (A) に示した CO_2 濃度。

また、pH 8.4 条件で 5% CO₂ を通気すると、CO₂ 濃度は $83 \pm 6.4 \mu\text{M}$ に上昇し、CV 値は上昇し、LCIB は葉緑体中に分散したことから、LCIB の局在変化は pH の上昇によるものではなかった (図 2-5A, B)。

異なる pH 条件において、細胞を含まない培地に 0.12% CO₂ 通気を行なった場合と、細胞培養液に 0.12% CO₂ 通気を行なった場合の CO₂ 濃度を比較したところ、細胞を含まないときの方がより高い CO₂ 濃度を示した (図 2-5C)。この結果は、明条件では培養液中の細胞が光合成を行うことで、通気された CO₂ を消費することを示している。先行研究において、暗条件かつ 0.04% CO₂ 通気条件では LCIB のピレノイドに集合せず、LCIB は葉緑体中に分散することから、LCIB の局在は光によっても制御を受けることが示唆された (図 1-3C, D; Yamano et al., 2010)。さらに、明条件かつ 5% CO₂ 通気条件で LCIB が分散した細胞に、光合成電子伝達阻害剤 DCMU を添加すると、明条件かつ 0.04% CO₂ 通気条件に移しても LCIB のピレノイド周囲への再集合が起こらないことから、LCIB のピレノイド周囲への局在変化には、CO₂ 濃度の低下に加えて光合成の電子伝達が必要であると考えられた (図 1-5A; Yamano et al., 2010)。しかし、これらの暗条件または DCMU 添加条件において、培養液中の CO₂ 濃度は測定されておらず、光合成が停止した影響で培養液中の CO₂ 濃度が低下せず、LCIB が分散した可能性も考えられた。そこで、明暗条件あるいは DCMU 添加条件において、実際の溶存 CO₂ 濃度を測定しながら局在を観察することで、LCIB の局在変化に対する光と CO₂ 濃度の影響を詳細に調べた (図 2-6A, B)。明条件かつ 0.04% CO₂ 通気条件で処理し、LCIB をピレノイド周囲に局在させた細胞を用いて、暗条件に移すと 2 時間後には、CO₂ 濃度は $12 \pm 0.4 \mu\text{M}$ に上昇し、LCIB は葉緑体中に分散した (図 2-6A)。CO₂ 濃度が上昇した理由として、暗条件では光合成が停止するため CO₂ が消費されないこと、呼吸による CO₂ 放出、暗条件で光合成が停止した際に細胞内に濃縮されていた C_i が放出された可能性が考えられた。次に、暗条件のまま 0.04% または 0.001% の非常に低い濃度の CO₂ 通気条件に 3 時間移し、LCIB の局在を比較した。0.04% CO₂ 通気条件では CO₂ 濃度は $18 \pm 0.2 \mu\text{M}$ の低 CO₂ 条件を維持し、LCIB の局在は分散したままであったが、0.001% CO₂ 通気条件では CO₂ 濃度は $2.6 \pm 0.1 \mu\text{M}$ の超低 CO₂ 条件に低下し、LCIB は暗条件にも関わらずピレノイド周囲に集合した (図 2-6A)。

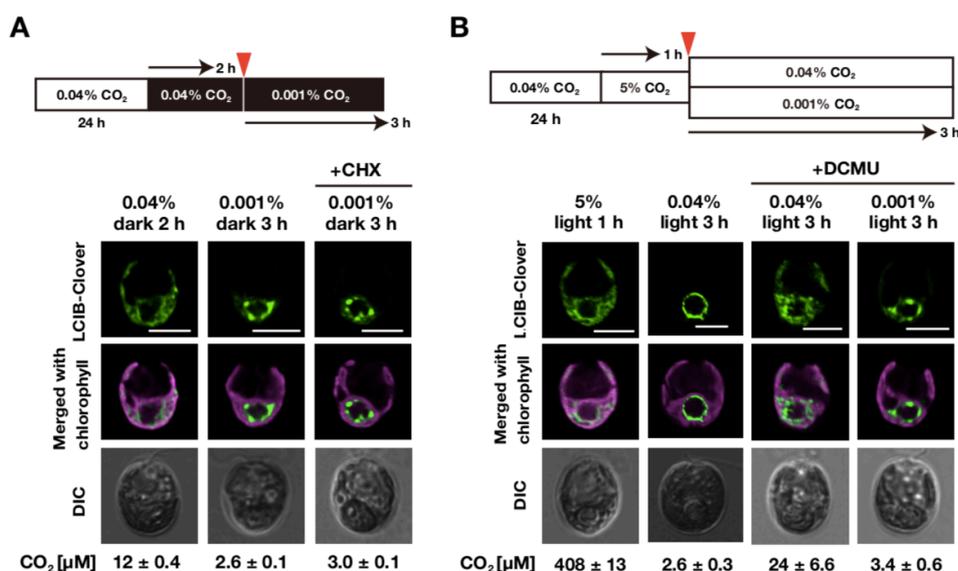


図 2-6. 暗条件および DCMU 添加条件下の MBC-3 株における LCIB の細胞内局在

(A) 暗条件およびシクロヘキシミド (CHX) 添加条件下における代表的な LCIB-Clover 蛍光観察像。緑色は LCIB-Clover に由来する蛍光、マゼンタ色はクロロフィルに由来する自家蛍光を示し、中段にその重ね合わせ像を示す。連続白色光を照射しながら 0.04% CO₂ 通気条件で 24 時間培養した MBC-3 株の細胞を、0.04% CO₂ 通気条件のまま暗条件に移して 2 時間後の細胞を観察した。培地交換後、暗条件のまま 0.001% CO₂ 通気条件に移して 3 時間、6 時間後の細胞を観察した。CHX (10 μg/mL) を添加した時点を赤色の矢尻で示した。細胞培養液中の CO₂ 濃度を画像の下に示した。DIC：微分干渉像、スケールバー：5 μm。

(B) 光合成電子伝達阻害剤 DCMU 添加条件下における代表的な LCIB-Clover 蛍光観察像。連続白色光を照射しながら 0.04% CO₂ 通気条件で 24 時間培養した MBC-3 株の細胞を、光条件を変えずに 5% CO₂ 通気条件に移して 1 時間後の細胞を観察した。培地交換後、光条件を変えずに 0.04%あるいは 0.001% CO₂ 通気条件に移して 3 時間後の細胞を観察した。DCMU (10 μM) を添加した時点を赤色の矢尻で示した。細胞培養液中の CO₂ 濃度を画像の下に示した。DIC：微分干渉像、スケールバー：5 μm。

明条件かつ 0.04% CO₂ 通気条件で処理し、LCIB をピレノイド周囲に局在させた細胞を用いて、5% CO₂ 通気条件に移すと 1 時間後には、CO₂ 濃度は 408 ± 13 μM の高 CO₂ 条件を示し、LCIB は葉緑体中に分散した (図 2-6B)。次に、0.04% CO₂ 通気条件に移してから 3 時間後には、CO₂ 濃度は 2.6 ± 0.3 μM の超低 CO₂ 条件に低下し、LCIB はピレノイド周囲に集合した (図 2-6B)。一方、DCMU の添加後に 0.04% CO₂ 通気条件に移すと 3 時間後には過去の知見通り、LCIB は分散したままであったが、CO₂ 濃度は超低 CO₂ 条件ではなく 24 ± 6.6 μM の低 CO₂ 条件を示した (図 2-6B)。CO₂ 濃度が上昇した理由として、DCMU を添加すると、電子伝達反応の阻害により光合成が停止するため、CO₂ が消費されないことが考えられた。そこで、DCMU 添加後に 0.001% CO₂ 通気条件に移したところ、3 時間後には CO₂ 濃度は 3.4 ± 0.6 μM の超低 CO₂ 条件を示し、LCIB はピレノイド周囲に集合した (図 2-6B)。これらの結果から、Yamano et al., 2010 で示さ

れた暗条件および DCMU 添加条件において LCIB が分散する理由は、光の有無ではなく培養液中の CO₂ 濃度が低下しなかったことが原因であり、暗条件でも超低 CO₂ 条件まで CO₂ 濃度を低下させると、LCIB はピレノイド周囲へと局在を変化させることが明らかとなった。

先行研究により、暗条件かつ 0.04% CO₂ 通気条件で LCIB が分散した細胞に、タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミド (CHX) を添加すると、明条件かつ 0.04% CO₂ 通気条件に移しても LCIB のピレノイド周囲への再集合が起こらないことが報告されている (図 1-5B; Yamano et al., 2014)。このことから、LCIB がピレノイド周囲へ局在変化するためには、明条件かつ 0.04% CO₂ 通気条件で LCIB 以外のタンパク質の新規合成が必要である可能性や、タンパク質のターンオーバーによって新規合成された LCIB がピレノイド周囲へ局在する可能性が議論されていた。しかし、CHX を添加すると、核にコードされる光合成関連タンパク質および CCM 関連タンパク質の合成が阻害され、光合成が停止した影響で培養液中の CO₂ 濃度が低下せず、LCIB が分散した可能性も考えられた。そこで、CHX の添加後に培地中の CO₂ 濃度を強制的に超低 CO₂ 条件にした時の LCIB の局在を調べた (図 2-6A)。暗条件かつ 0.04% CO₂ 通気条件において LCIB が分散した細胞に CHX を添加し、暗条件かつ 0.001% CO₂ 通気条件に 3 時間移した。すると CO₂ 濃度は $3.0 \pm 0.1 \mu\text{M}$ の超低 CO₂ 条件を示し、LCIB はピレノイド周囲へと局在を変化させた (図 2-6A)。以上の結果から、LCIB がピレノイド周囲へ局在化するためにはタンパク質の新規合成は必要ないこと、また CO₂ 濃度の低下に伴い LCIB 自身が移動することが示唆された。

ここまでの LCIB の局在観察では、明条件かつ超低 CO₂ 条件で 24 時間処理した細胞を用いた。そこで、LCIB がピレノイド周囲へと局在化するために、あらかじめ明条件かつ超低 CO₂ 条件を誘導する必要性を検討するため、明条件かつ高 CO₂ 条件で 24 時間処理した細胞を用いて LCIB の局在変化を観察した。はじめに、細胞を明条件かつ 5% CO₂ 通気条件で処理すると、CO₂ 濃度は $437 \pm 30 \mu\text{M}$ と高く、LCIB は葉緑体全体に分散した (図 2-7)。次に、明条件かつ 0.001% CO₂ 条件に移すと、3 時間後、6 時間後の CO₂ 濃度はそれぞれ $1.3 \pm 0.3 \mu\text{M}$ 、 $1.4 \pm 0.5 \mu\text{M}$ の超低 CO₂ 条件を示し、6 時間後には LCIB がピレノイド周囲へと集合した (図 2-7)。一方、暗条件かつ 0.001% CO₂ 条件

に移すと、3時間後、6時間後の CO₂ 濃度はそれぞれ $2.5 \pm 0.4 \mu\text{M}$ 、 $2.1 \pm 0.5 \mu\text{M}$ と超低 CO₂ 条件を示したにも関わらず、6 時間後でも LCIB は葉緑体内に分散したままであった。高 CO₂ 条件で処理した細胞を暗条件かつ超低 CO₂ 条件に移しても LCIB はピレノイドへ局在しないことから、LCIB がピレノイド周囲に局在変化するためには、CO₂ 濃度の低下のみでは不十分であり、明条件かつ超低 CO₂ 条件に 6 時間以上処理していることが必要であることが示唆された。

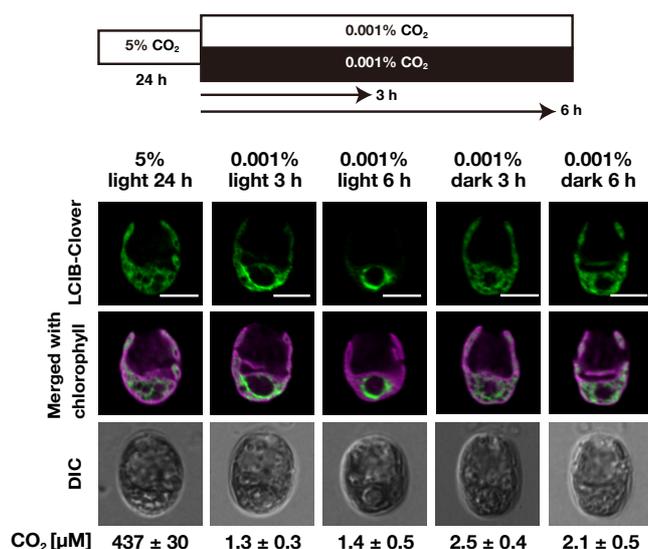


図 2-7. 高 CO₂ 条件誘導後の MBC-3 株における LCIB の細胞内局在

緑色は LCIB-Clover に由来する蛍光、マゼンタ色はクロロフィルに由来する自家蛍光を示し、中段にその重ね合わせ像を示す。連続白色光を照射しながら 5% CO₂ 通気条件で 24 時間培養した MBC-3 株の細胞を培地交換し、光条件を変えずに 0.001% CO₂ を通気した条件、または暗条件かつ 0.001% CO₂ を通気条件に移し、3 時間および 6 時間後の細胞について、LCIB-Clover 蛍光を観察した。細胞培養液中の CO₂ 濃度を画像の下に示した。DIC：微分干渉像、スケールバー：5 μm。

2. LCIB 局在異常株の単離

溶存 CO₂ 濃度の低下に依存して LCIB がピレノイド周囲へ局在するために必要な因子を明らかにするため、超低 CO₂ 条件において LCIB の局在が異常を示す変異株をスクリーニングした。はじめに、*lcb* 変異株 B1 へ LCIB-Clover 発現コンストラクト pCT1 (図 2-2B) を形質転換し、最も蛍光輝度が高い株 AN-1 を作出した。AN-1 株は LCIB-Clover 融合タンパク質の蓄積に伴い、LCIB の蓄積が回復した (図 2-8A)。さらに、LCIB-Clover タンパク質が細胞内で機能的であるかを調べるため、野生株 CC-5325、B1、および AN-1 株における生育判定のためのスポットテストと酸素発生速度測定を行なった (図 2-8B,C)。スポットテストにより、高 CO₂ 条件 (5% CO₂) におい

て、いずれの株においても生育速度に差は無かったが、低 CO₂ 条件 (0.04% CO₂)、超低 CO₂ 条件 (<0.01% CO₂) とともに B1 株の生育が顕著に遅延した (図 2-8B)。一方、AN-1 株では、低 CO₂ 条件と超低 CO₂ 条件における生育が CC-5325 株と同程度に回復した。次に、0.04% CO₂ 通気条件に順化した細胞を用いて酸素発生速度を測定したところ、B1 株では酸素発生速度が顕著に低下したが、AN-1 株において CC-5325 株と同程度まで回復した (図 2-8C)。これらの結果から、AN-1 株において LCIB-Clover 融合タンパク質が細胞内で機能的であることが示された。

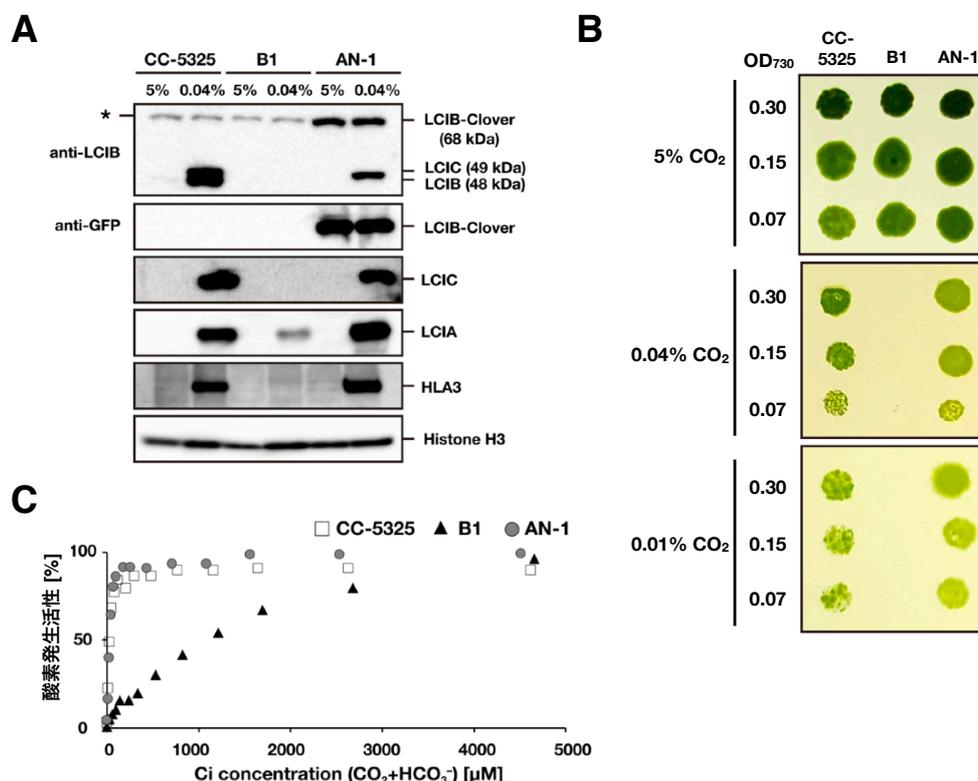


図 2-8. 変異株スクリーニングの親株に用いた LCIB-Clover 発現株 AN-1 の表現型

(A) CC-5325、B1、AN-1 株におけるウェスタンブロットによる LCIB-Clover の蓄積量。5% CO₂ 通気条件で培養した細胞を 5% または 0.04% CO₂ 通気条件に移して 12 時間後の細胞からタンパク質を抽出した。抗 LCIB 特異抗体を用いたとき、交差反応により内在性の LCIC も検出された。*は抗 LCIB 特異抗体を用いたときに C9 株と 99-4 株で検出された非特異的バンドを示すが、その位置は AN-1 株で検出された LCIB-Clover のサイズと被っている。Histone H3 はローディングコントロールに用いた。

(B) CC-5325、B1、AN-1 株における生育判定のためのスポットテスト。OD₇₃₀ を 0.30、0.15、0.07 に合わせた細胞懸濁液を、炭素源を含まない寒天培地に滴下し、連続白色光を照射しながら高 CO₂ (5%) 条件、低 CO₂ (0.04%) 条件、超低 CO₂ (0.01%) 条件でそれぞれ 4、5、6 日間培養し、写真を撮影した。

(C) CC-5325、B1、AN-1 株の酸素発生速度速度のプロット図。5% CO₂ 通気条件で培養した細胞を 5% または 0.04% CO₂ 通気条件に移してから 12 時間後に用いた。細胞内の無機炭素 (Ci) を枯渇させた状態から、NaHCO₃ を低濃度から徐々に加えた時の酸素発生速度 (Y 軸) と溶存 Ci 濃度 (X 軸) をプロットした。実験は独立した 3 回以上の測定を行い、典型的な測定値をプロットした。

一方、B1 株は *lcib* 変異株に特徴的な超低 CO₂ 条件で酸素発生速度が増加し、低 CO₂ 条件では減少し、高 CO₂ 条件では再び増加する二相性のグラフを示さなかった。この原因として、B1 株では超低 CO₂ 条件で働く HCO₃⁻ 輸送体 HLA3 と LCIA の蓄積量が低下していたことによる可能性が考えられる (図 2-8A)。しかし、AN-1 株では野生株と同程度に HLA3 および LCIA の蓄積が相補し、酸素発生速度の回復が認められたため、AN-1 株において LCIB-Clover が細胞内で機能的であると考え、AN-1 株を LCIB の局在異常株のスクリーニングの親株として使用した。

AN-1 株に対して、スペクチノマイシン耐性を付与する *aadA* カセット (Meslet-Cladière, Vallon, 2011) のランダム変異導入を行い、2,400 個のスペクチノマイシン耐性株を取得した。これらについて 1 株ずつ LCIB-Clover 蛍光の観察を行い、超低 CO₂ 条件でも LCIB が葉緑体中に分散する局在異常株を 4 株 (4-D1、16-F5、21-A5、22-B8) 単離した (図 2-9)。これらの株について、*aadA* カセットの 3' 側に設計したプライマー (DP) と縮重プライマーを用いて TAIL-PCR を行い、それぞれの株のゲノムに *aadA* が挿入された位置の近傍配列を得た (表 2-4)。その中から、デンプン鞘の形態が異常を示す 4-D1 株について注目し、解析を進めた。

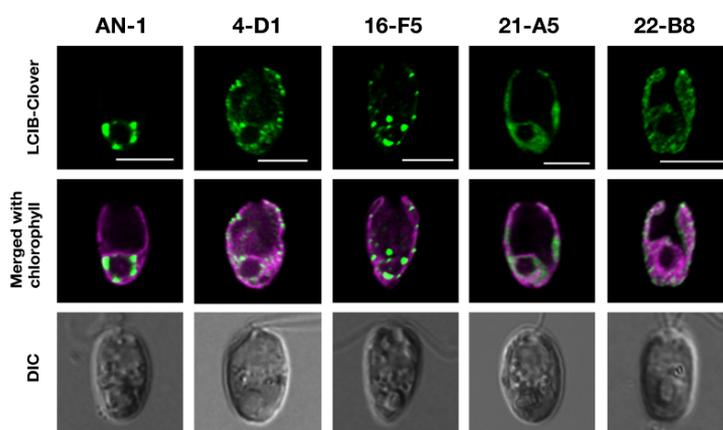


図 2-9. スクリーニングによって取得した 4 株の LCIB の局在異常株

明条件かつ 0.04% CO₂ 通気条件で 12 時間培養した後の細胞について、LCIB-Clover 蛍光を観察した。緑色は LCIB-Clover に由来する蛍光、マゼンタ色はクロロフィルに由来する自家蛍光を示し、中段にその重ね合わせ像を示す。DIC：微分干渉像、スケールバー：5 μm。

表 2-4. LCIB 局在異常株において *aadA* カセットが挿入された配列近傍の遺伝子情報

株名	遺伝子座	遺伝子名	予測される機能	<i>aadA</i> の挿入 部位・方向
4-D1	<i>Cre03.g155001</i>	<i>ISA1</i>	Isoamylase1 (<i>ISA1</i>)	13th intron, -
16-F5	<i>Cre12.g550850</i>	<i>PSBP1</i>	Photosystem II Oxygen Evolution Enhancer protein 2 (<i>PSBP1</i>)	3rd exon, +
21-A5	<i>Cre07.g326450</i>	<i>VPS5B</i>	Subunit of Retromer complex (<i>VPS5B</i>)	1st exon, -
	<i>Cre09.g411200</i>	<i>TEF5</i>	Rieske [2Fe-2S] domain containing protein (<i>TEF5</i>)	2nd intron, +
22-B8	<i>Cre16.g654300</i>	<i>RSP23</i>	Radial spoke protein 23 (<i>RSP23</i>)	3rd exon, +

LCIB 局在異常株において *aadA* カセットが挿入する遺伝子座 (例 *Cre16.g654300*: *Cre* はクラミドモナスを、16 は染色体番号を、*g654300* は染色体上の位置を示す)、遺伝子名、コードされるタンパク質の機能、挿入位置と方向 (+: センス方向、 -: アンチセンス方向) を示している。

3. LCIB 局在異常株 4-D1 におけるデンプン鞘の形態と LCIB の局在との関係

4-D1 株では、Isoamylase1 (*ISA1*) をコードする *Cre03.g155001* 配列の第 13 イントロン内部に *aadA* カセットの挿入があった (図 2-10A)。*aadA* カセットの 3' 側に設計した DP プライマーと *ISA1* 配列の 11th イントロン内部に設計した F6 プライマーを用いてゲノミック PCR を行なったところ、野生株では増幅が見られず 4-D1 株で増幅断片を確認した (図 2-10A,B)。一方、*aadA* カセットの 5' 側に位置する UP プライマーと、*ISA1* 配列の 14th イントロン内部に設計した R6 プライマーを用いた PCR では増幅断片は確認できなかったことから、*aadA* カセットの挿入に伴って *aadA* の 5' 側と *ISA* のゲノム配列の境界領域で DNA の組み替えが起きた可能性が示唆された (図 2-10A,B)。次に、qRT-PCR により、AN-1 株と 4-D1 株における *ISA1* の発現量を調べた (図 2-10C)。AN-1 株では 5% CO₂ 通気条件から 0.04% CO₂ 通気条件に移すことで mRNA の発現が誘導されたが、4-D1 株では検出されなかった。このことから、4-D1 株は *aadA* カセットの挿入によって *ISA1* の発現が損なわれた *ISA1* 欠損変異株であることが示された。

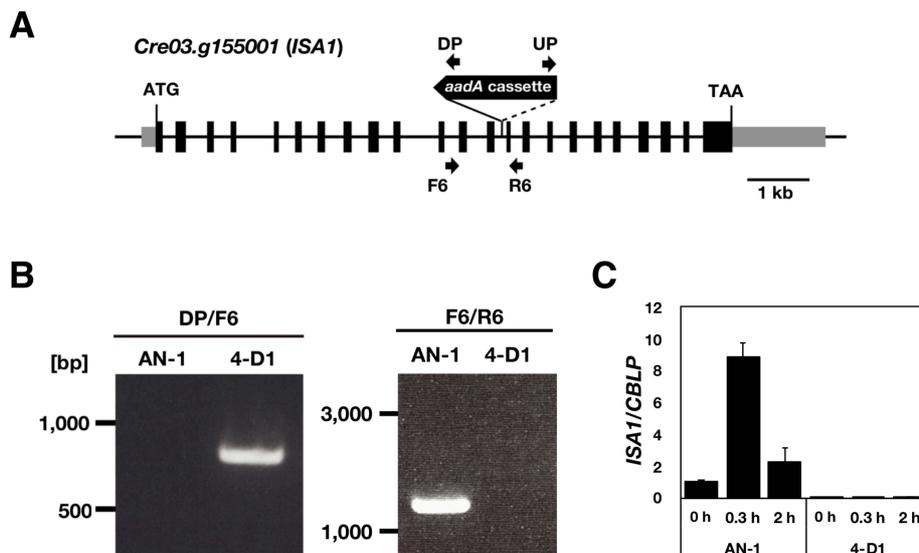


図 2-10. 4-D1 株における *aadA* カセットの挿入位置および *ISA1* の転写物量

(A) 4-D1 株における *aadA* カセットの挿入箇所。左上に遺伝子座と遺伝子名を示す。黒い四角はエキソン、黒線はイントロン、灰色の四角は非翻訳領域を示す。PCR に用いたプライマーを矢印で示す。ATG はスタートコドン、TAA はストップコドンを示す。

(B) 4-D1 株における *aadA* カセット挿入を調べる PCR。DP/F6 プライマーセットと F6/R6 プライマーセットを用いた。4-D1 株の親株である AN-1 株をコントロールに用いた。bp：塩基対。

(C) qRT-PCR による 4-D1 株における *ISA1* 遺伝子の相対的発現量。明条件かつ 5% CO₂ 通気条件に順化した細胞 (0 h) を 0.04% CO₂ 通気条件に移行して、20 分 (0.3 h)、2 時間後 (2 h) の細胞を回収し、全 RNA を抽出した。実験は独立した 3 回以上の実験の平均値とその標準偏差を示す。

先行研究により、*ISA1* 遺伝子はデンプン合成変異株である *sta7* の原因遺伝子として報告されており、*ISA1* にコードされる Isoamylase1 はデンプン枝切り酵素としてデンプン合成に必須であることが示されている (Mouille et al., 1996)。4-D1 株に見られる表現型が *ISA1* タンパク質の発現によって相補されるかを調べるため、*ISA1* 遺伝子配列に CrmCHERRY と 3×FLAG タグを連結した発現プラスミド pTMZ1-*ISA1* を 4-D1 株へ形質転換した (図 2-11A)。このとき、ゼオシン耐性を付与する *ble* マーカーを選抜に使用した。単離したゼオシン耐性株のうち 2 株について、*ISA1*-CrmCHERRY-3FLAG の蓄積を調べたところ、C1 および C2 株ともに、予測質量の 121 kDa 付近に、約 110 kDa と 120 kDa のバンドが検出された (図 2-11B)。*ISA1* のタンパク質配列は、GenBank には AY324649 (96.3 kDa) として、Phytozome には *Cre03.g155001* (115.7 kDa) として、それぞれ異なる長さのアミノ酸配列が登録されている。従って、検出された二本のバンドは mRNA のスプライシングバリエーションに由来する可能性や、*ISA1* 配列のプロセッシングやリン酸化およびグリコシル化などの翻訳後修飾による可能性が考えられる。

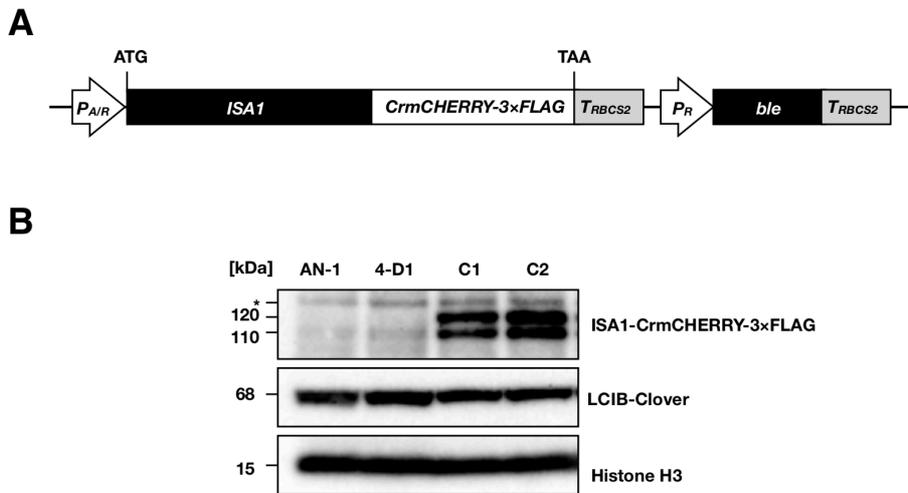


図 2-11. 4-D1 株の相補株 C1、C2 の単離

(A) *ISA1* 遺伝子発現プラスミド pTMZ1-ISA1 の構造。P_{AIR}: *HSP70A/RBCS2* プロモーター、P_R: *RBCS2* プロモーター、T_{RBCS2}: *RBCS2* 遺伝子の 3'-UTR。ble: ゼオシン耐性遺伝子。

(B) AN-1、4-D1、C1 および C2 株におけるウェスタンブロット解析による ISA1-CrmCHERRY-3FLAG と LCIB-Clover の蓄積量。5% CO₂ 通気条件で培養した細胞を 5% または 0.04% CO₂ 通気条件に移してから 12 時間後に用いた。ISA1-CrmCHERRY-3FLAG の検出には抗 FLAG 特異抗体を、LCIB-Clover の検出には抗 LCIB 特異抗体を用いた。*は抗 FLAG 特異抗体によって検出される非特異的バンドを示す。ローディングコントロールとして Histone H3 を用いた。

AN-1、4-D1、C1、C2 株のデンプン蓄積について、ヨウ素染色により、デンプンの蓄積レベルを視覚的・定量的に確認した (図 2-12A,B)。AN-1、C1、および C2 株はデンプンに由来する暗紫色に呈色した (図 2-12A)。細胞体積あたりのデンプン量はそれぞれ $10.2 \pm 0.9 \mu\text{g mm}^{-3}$ 、 $9.3 \pm 1.9 \mu\text{g mm}^{-3}$ 、 $9.1 \pm 0.4 \mu\text{g mm}^{-3}$ であり、有意な差はなかった (図 2-12B)。また、ヨウ素液を滴下した細胞を明視野で観察したところ、ピレノイド周囲のデンプン鞘の染色が認められた。一方、4-D1 株ではデンプンが蓄積しないため、ヨウ素液を加えても淡黄色のままであり、ピレノイド周囲のデンプン鞘の染色も認められなかった (図 2-12A)。4-D1 株のデンプン量は $0.8 \pm 0.1 \mu\text{g mm}^{-3}$ となり、野生株や相補株の約 8% に低下していた (図 2-12B)。

次に、透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いてデンプン鞘の形態を観察した (図 2-13A)。AN-1、C1 および C2 株では、ピレノイド周囲に厚いデンプンプレートによって構成されるデンプン鞘の発達が見られた。一方、4-D1 株ではデンプン鞘の発達は見られず、ピレノイド周囲に小さな異常デンプン粒が、低密度に集まる様子が観察された。ピレノイド周囲のデンプン鞘の面積を定量化したところ、4-D1 におけるデンプン

鞘面積は $0.37 \mu\text{m}^2$ であり、AN-1 ($1.67 \mu\text{m}^2$)、C2 ($2.85 \mu\text{m}^2$) と比べて顕著に低い値を示した (図 2-13B)。

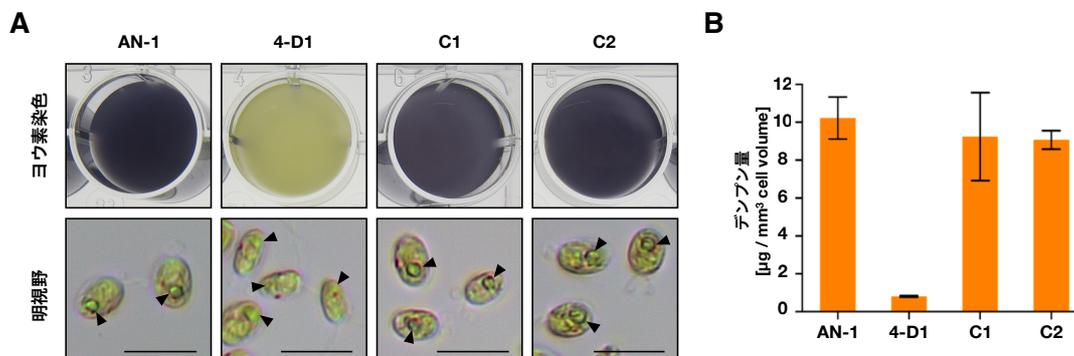


図 2-12. AN-1、4-D1、C1 および C2 株のデンプンの蓄積レベル

(A) AN-1、4-D1、C1 および C2 株におけるヨウ素染色によるデンプンの蓄積レベル。5% CO_2 通気条件で培養した細胞を 0.04% CO_2 通気条件に移して 24 時間後の細胞の抽出物を、ヨウ素液によって染色した (上段)。細胞培養液にヨウ素液を添加し、明視野で観察した (下段)。スケールバー：5 μm 。

(B) AN-1、4-D1、C1 および C2 株における細胞体積当たりのデンプン量。5% CO_2 通気条件で培養した細胞を 0.04% CO_2 通気条件に移して 24 時間後の細胞についてデンプンの定量測定を行った。実験は独立した 3 回以上の実験の平均値とその標準偏差を示す。

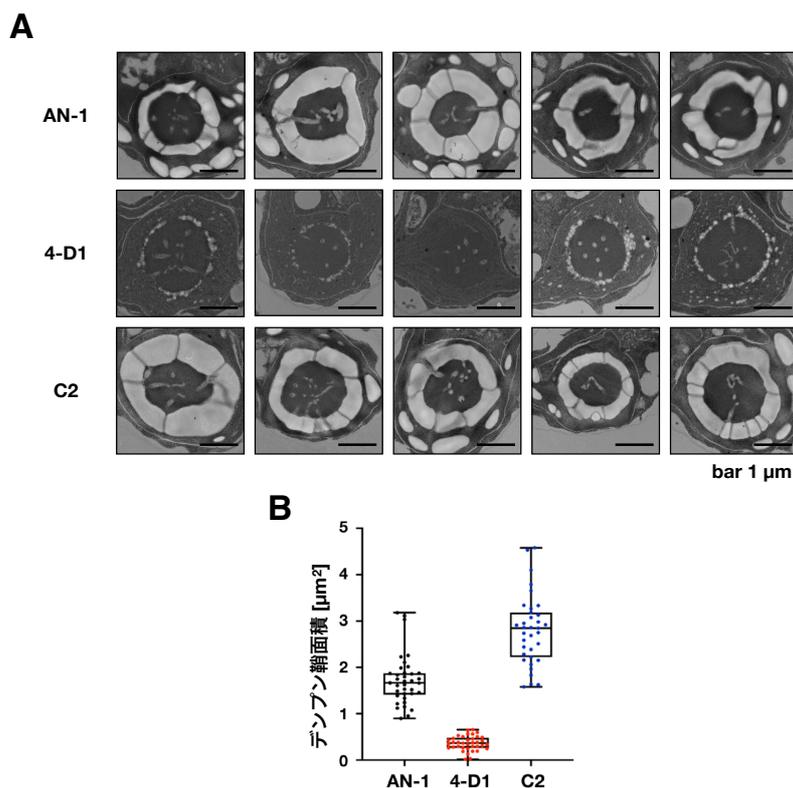


図 2-13. AN-1、4-D1 および C2 株のデンプン鞘観察

(A) AN-1、4-D1 および C2 株におけるデンプン鞘の TEM 観察像。5% CO_2 通気条件で培養した細胞を 0.04% CO_2 通気条件に移して 24 時間後の細胞を観察した。スケールバー：1 μm 。

(B) TEM 観察像から算出したデンプン鞘の面積。中央値と四分位範囲を示すエラーバーによって表す (n=35~37)。

AN-1、4-D1、および C2 株における CO₂ 濃度変化に応じた LCIB 局在パターンを調べるために、培養液中の CO₂ 濃度を測定しながら LCIB-Clover の細胞内局在を観察した (図 2-14A)。得られた画像から、LCIB-Clover 蛍光シグナルの CV 値を算出し、LCIB の局在パターンを定量化し (図 2-14B)、3 次元像を構築した (図 2-14C)。はじめに、明条件かつ 5% CO₂ 通気条件に順化させた条件では、AN-1、4-D1 および C2 株の CV 値の中央値はそれぞれ 0.77、0.76、0.81 と低い値を示し、LCIB-Clover は葉緑体中に分散した (図 2-14A,B)。次に、0.04% CO₂ 通気条件に移してから 12 時間後には、全ての株で培養液中の CO₂ 濃度は 1.7–3.0 μM の超低 CO₂ 条件を示した。この時、AN-1 株と C2 株の CV 値はそれぞれ 1.22、1.17 に上昇し、LCIB はピレノイド周囲にリング状に集合したが、4-D1 株の CV 値は 0.75 と低いままで、LCIB は葉緑体中に分散したままであった (図 2-14A,B)。さらに、0.04% CO₂ 通気条件に移してから 24 時間後には、全ての株で培養液中の CO₂ 濃度は 2.1–3.1 μM の超低 CO₂ 条件を維持した。このとき、AN-1 と C2 株の CV 値は 1.55、1.31 とわずかに上昇し、LCIB のピレノイド周囲におけるリング状の局在を維持した (図 2-14A,B)。一方、4-D1 株でも CV 値は 1.37 へと上昇したが、LCIB は葉緑体基底側に凝集する局在異常を示した (図 2-14A,B)。24 時間後における LCIB-Clover 蛍光の 3 次元構築画像より、AN-1 株および C2 株では LCIB はピレノイドの周囲にグローブ状に局在し、4-D1 株では一箇所に凝集した (図 2-14C)。これらの結果から、超低 CO₂ 条件において LCIB がピレノイド周囲にリング状に集合するために、デンプンの蓄積およびデンプン鞘形成が必要であることが示唆された。

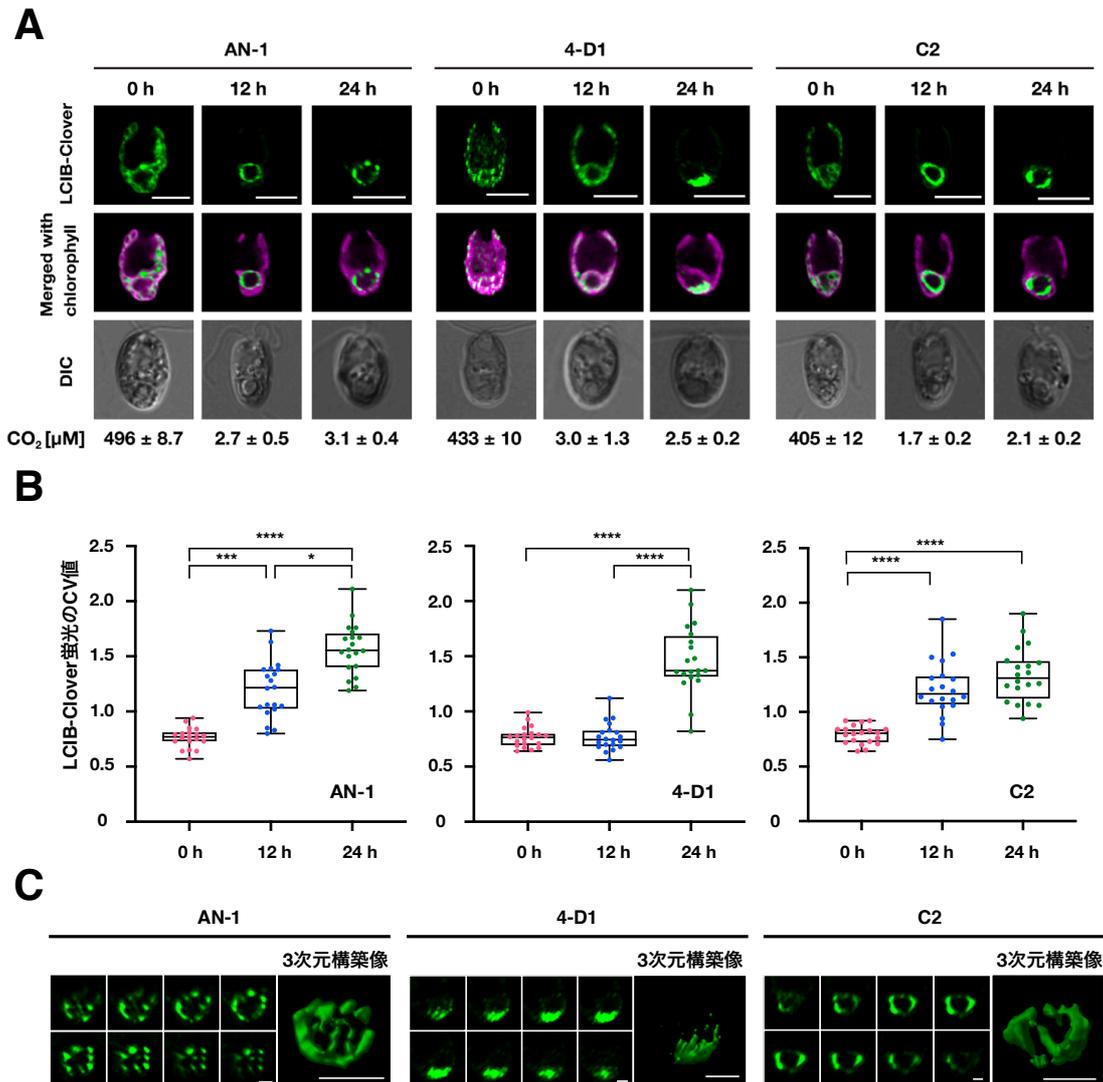


図 2-14. AN-1、4-D1 および C2 株における LCIB の細胞内局在

(A) AN-1、4-D1 および C2 株における経時的な LCIB-Clover 蛍光観察像。緑色は LCIB-Clover に由来する蛍光、マゼンタ色はクロロフィルに由来する自家蛍光を示し、中段にその重ね合わせ像を示す。明条件かつ 5% CO₂ 通気条件 (0 h) で培養した MBC-3 株の細胞を、培地交換後、0.04% CO₂ 通気条件に移して 12 時間、24 時間後の細胞について、LCIB 蛍光シグナルの局在変化を観察した。細胞培養液中の CO₂ 濃度をそれぞれの画像の下に示した。DIC：微分干渉像、スケールバー：5 μm。

(B) AN-1、4-D1 および C2 株における LCIB-Clover 蛍光の局在パターンの定量化。LCIB-Clover の局在を定量化するため、それぞれの細胞における LCIB-Clover 蛍光強度の変動係数 (CV 値) を算出した。CV 値は中央値と四分位範囲を示すエラーバーによって表す (n=19-20)。Kruskal-Wallis 法による分散分析を行った後、Dunn 法による多重比較検定を行い、異なる条件間の統計的有意差を評価した。* *P* 値 < 0.05; *** *P* 値 < 0.001; **** *P* 値 < 0.0001。

(C) AN-1、4-D1 および C2 株における LCIB-Clover 蛍光の 3 次元構築。(A) に示した明条件かつ 0.04% CO₂ 通気 24 時間後の細胞について、スタック画像とその 3 次元構築像を示す。

4. デンプン合成変異株におけるデンプン鞘の形態と LCIB の局在との関係

LCIB のピレノイド周囲への局在とデンプン鞘形成との関係についてさらに調べるため、2種類の異なるデンプン合成変異株 *stall-1* および *sta2-1* を用いて LCIB の局在を観察した。*stall-1* は α -1,4 glucanotransferase の欠損株であり、4-D1 株と同様にデンプンをほとんど蓄積しない (Colleoni et al., 1999a)。一方、*sta2-1* は Granule-bound starch synthase I (GBSSI) の変異により、アミロースを蓄積せず、修飾アミロペクチンを蓄積し、野生株と比べて薄いデンプン鞘を形成する (Delrue et al., 1992; Izumo et al., 2011)。これらの変異株とその親株である CC-4323 についてデンプン鞘の形態を観察した (図 2-15A)。*stall-1* ではピレノイド周囲に不規則な方向を示す小さいデンプンプレートが数個観察されたが、ピレノイドを取り囲むデンプン鞘は形成されなかった。*sta2-1* ではピレノイド周囲に CC-4323 と比べて薄いデンプン鞘形成が観察された。デンプン鞘の面積を定量化したところ、CC-4323 は $1.45 \mu\text{m}^2$ であるのに対して *sta2-1* は $0.91 \mu\text{m}^2$ であり、

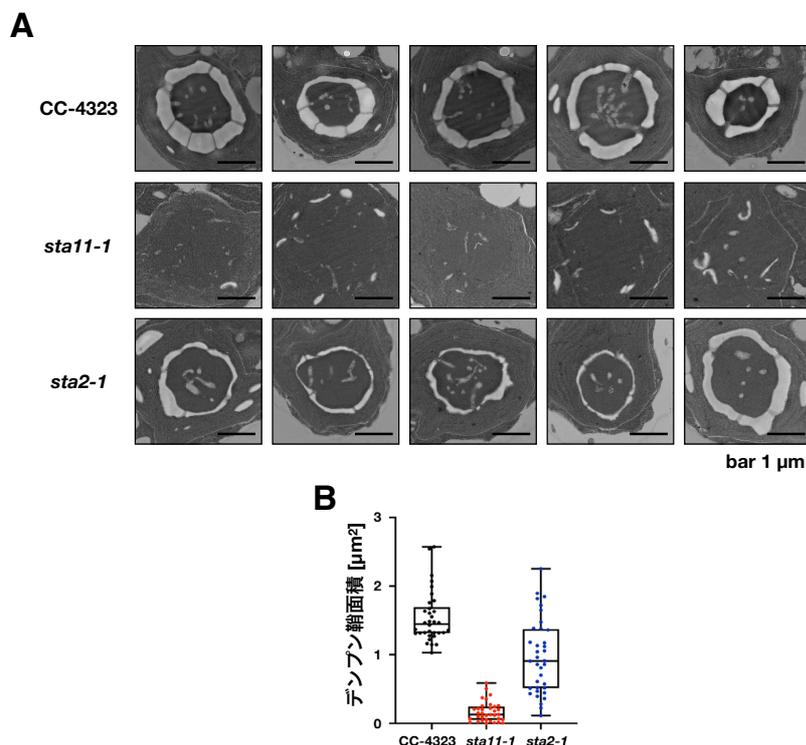


図 2-15. CC-5325、*stall-1*、*sta2-1* 株のデンプン鞘観察

(A) CC-5325、*stall-1*、*sta2-1* 株におけるデンプン鞘の TEM 観察像。5% CO_2 通気条件で培養した細胞を 0.04% CO_2 通気条件に移して 24 時間後の細胞を観察した。スケールバー：1 μm 。

(B) TEM 観察像から算出したデンプン鞘の面積。中央値と四分位範囲を示すエラーバーによって表す (n=35~37)。

約 60%に減少していた。*stall-1* のデンンプレート面積は $0.17\mu\text{m}^2$ であり、CC-4323 と比べて顕著に低い値を示した (図 2-15B)。

stall-1 および *sta2-1* における LCIB の局在変化を調べるため、LCIB-Clover 発現プラスミド pCT1 (図 2-2B) を形質転換し、LCIB-Clover 蛍光を示した株をそれぞれ *stall-BC* および *sta2-BC* と名付けた。CC-4323、*stall-BC*、および *sta2-BC* 株について、ヨウ素染色により、デンプンの蓄積レベルを視覚的・定量的に調べた (図 2-16A,B)。

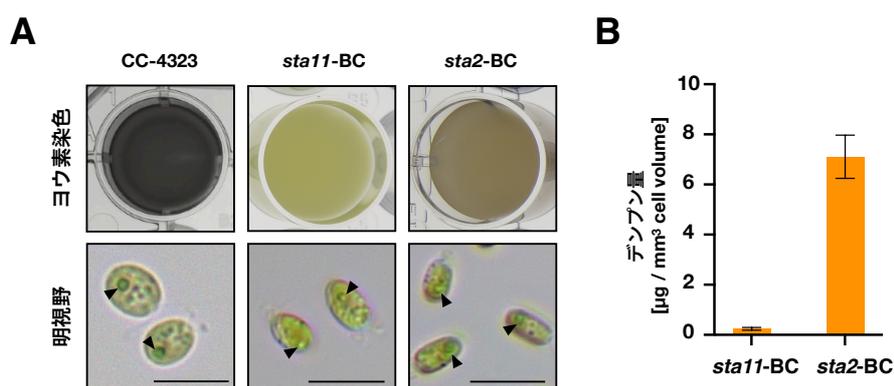


図 2-16. CC-4323、*stall-BC*、*sta2-BC* 株のデンプンの蓄積レベル

(A) CC-4323、*stall-BC*、*sta2-BC* 株におけるヨウ素染色によるデンプンの蓄積レベル。5% CO₂ 通気条件で培養した細胞を 0.04% CO₂ 通気条件に移して 24 時間後の細胞の抽出物を、ヨウ素液によって染色した (上段)。細胞培養液にヨウ素液を添加し、明視野で観察した (下段)。スケールバー：5 μm。

(B) CC-4323、*stall-BC*、*sta2-BC* 株における細胞体積当たりのデンンプン量。5% CO₂ 通気条件で培養した細胞を 0.04% CO₂ 通気条件に移して 24 時間後の細胞についてデンプンの定量測定を行った。実験は独立した 3 回以上の実験の平均値とその標準偏差を示す。

明条件かつ 0.04% CO₂ 通気培養後の細胞を加熱処理し、ヨウ素染色を行うと、*stall-BC* 株ではデンプンが蓄積しないため淡黄色のままであり (図 2-16A)、細胞体積あたりのデンンプン量はほとんど検出されなかった (図 2-16B)。一方、*sta2-BC* では修飾アミロペクチンが蓄積するため、ヨウ素液により赤褐色に呈色し (図 2-16A)、細胞体積あたりのデンンプン量は $7.1 \pm 1.2 \mu\text{g mm}^{-3}$ を示した (図 2-16B)。これらの株について、ヨウ素液を滴下した細胞を明視野で観察したところ、CC-4323 においてデンプン鞘の染色が認められたが、*stall-BC* ではデンプン鞘を形成しないため、デンプン鞘の染色は認められなかった (図 2-16A)。*sta2-BC* はデンプン鞘を薄く形成するが、修飾アミロペクチンの赤褐色の呈色により、視覚的に確認することが困難であった (図 2-16A)。

stall-BC および *sta2-BC* 株における CO₂ 濃度変化に応じた LCIB 局在パターンを調べるために、培養液中の CO₂ 濃度を測定しながら LCIB-Clover の細胞内局在を観察した

(図 2-17A)。得られた画像から、LCIB-Clover 蛍光シグナルの CV 値を算出し、LCIB の局在パターンを定量化し (図 2-17B)、3 次元像を構築した (図 2-17C)。

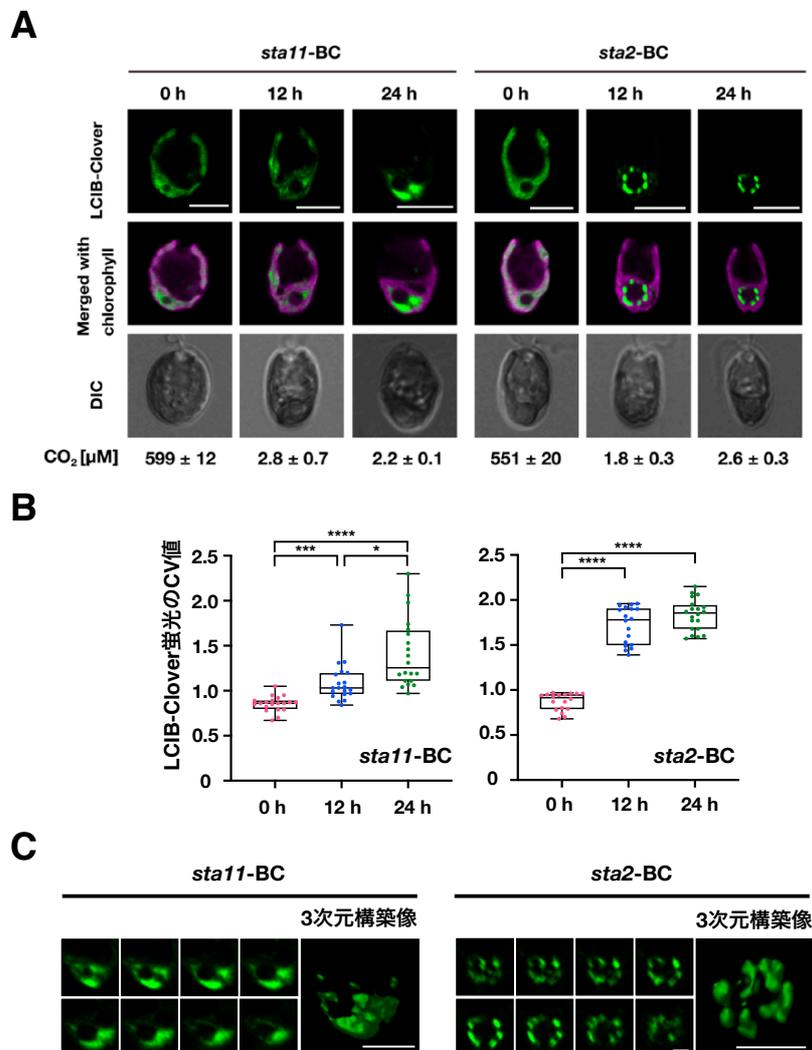


図 2-17. *sta11-BC*、*sta2-BC* 株における LCIB の細胞内局在

(A) *sta11-BC*、*sta2-BC* 株における経時的な LCIB-Clover 蛍光観察像。緑色は LCIB-Clover に由来する蛍光、マゼンタ色はクロロフィルに由来する自家蛍光を示し、中段にその重ね合わせ像を示す。明条件かつ 5% CO₂ 通気条件 (0 h) で培養した MBC-3 株の細胞を、培地交換後、0.04% CO₂ 通気条件に移して 12 時間、24 時間後の細胞について、LCIB 蛍光シグナルの局在変化を観察した。細胞培養液中の CO₂ 濃度をそれぞれの画像の下に示した。DIC：微分干渉像、スケールバー：5 μm。

(B) *sta11-BC*、*sta2-BC* 株における LCIB-Clover 蛍光の局在パターンの定量化。LCIB-Clover の局在を定量化するため、それぞれの細胞における LCIB-Clover 蛍光強度の変動係数 (CV 値) を算出した。CV 値は中央値と四分位範囲を示すエラーバーによって表す (n=19~20)。Kruskal-Wallis 法による分散分析を行った後、Dunn 法による多重比較検定を行い、異なる条件間の統計的有意差を評価した。* *P* 値<0.05; *** *P* 値<0.001; **** *P* 値<0.0001。

(C) *sta11-BC*、*sta2-BC* 株における LCIB-Clover 蛍光の 3 次元構築。(A) に示した明条件かつ 0.04% CO₂ 通気 24 時間後の細胞について、スタック画像とその 3 次元構築像を示す。

はじめに、明条件かつ 5% CO₂ 通気条件に順化させた条件では、*stall*-BC と *sta2*-BC 株の CV 値はそれぞれ 0.86、0.91 と低い値を示し、LCIB-Clover は葉緑体中に分散した。次に、0.04% CO₂ 通気条件に移してから 12 時間後には、いずれの株においても培養液は 1.8–2.9 μM の超低 CO₂ 条件を示した。このとき、*sta2*-BC 株の CV 値は 1.78 に上昇し、LCIB は正常にピレノイド周囲へ集合したが、*stall*-BC 株の CV 値は 1.03 と低いままで、4-D1 と同様に LCIB のピレノイド周囲への集合が遅延した。さらに 0.04% CO₂ 通気条件に移してから 24 時間後には、いずれの株においても培養液は 2.2–2.6 μM の超低 CO₂ 条件を維持した。このとき、*sta2*-BC 株の CV 値は 1.86 にわずかに上昇し、LCIB のピレノイド周囲のリング状の局在は維持された。また、*stall*-BC 株の CV 値は 1.26 へ上昇したが、4-D1 と同様に葉緑体基底側に凝集する局在異常を示した。24 時間後における LCIB-Clover 蛍光の 3 次元構築画像より、*sta2*-BC 株では LCIB はピレノイドの周囲にグローブ状に局在し、*stall*-BC 株では一箇所に凝集した (図 2-17C)。

以上の結果から、超低 CO₂ 条件において、ピレノイド周囲にデンプン鞘が形成されたとき、その厚みと組成に関係なく LCIB はピレノイド周囲へと局在化できることが示唆された。

超低 CO₂ 条件における LCIB のピレノイド周囲への局在化とデンプン鞘形成との関係について調べるため、さらに 2 種類の異なるデンプン合成変異株 *sta6-1* および *sta3-1* において、LCIB の細胞内局在解析を行なった。ADP-glucose pyrophosphorylase を欠損したデンプンを蓄積しない変異株 *sta6-1* (Zabawinski et al., 2001) と、soluble starch synthase III (SSSIII) を欠損したアミロペクチンを少量のみ蓄積し、アミロースを高蓄積する変異株 *sta3-1* (Maddelaine et al., 1994; Ral et al., 2006) についても同様に、LCIB の細胞内局在変化を観察した。それぞれの変異株に LCIB-Clover 発現プラスミド pCT1 (図 2-2B) を形質転換し、LCIB-Clover 蛍光を示した株をそれぞれ *sta6*-BC および *sta3*-BC と名付けた。はじめに、*sta6*-BC および *sta3*-BC 株について、ヨウ素染色により、デンプンの蓄積レベルを視覚的・定量的に確認した (図 12-18A,B)。明条件かつ 0.04% CO₂ 通気培養後の細胞を加熱処理し、ヨウ素染色を行うと、*sta6*-BC では淡黄色のままであり (図 12-18A)、デンプン量を蓄積していなかった (図 12-18B)。

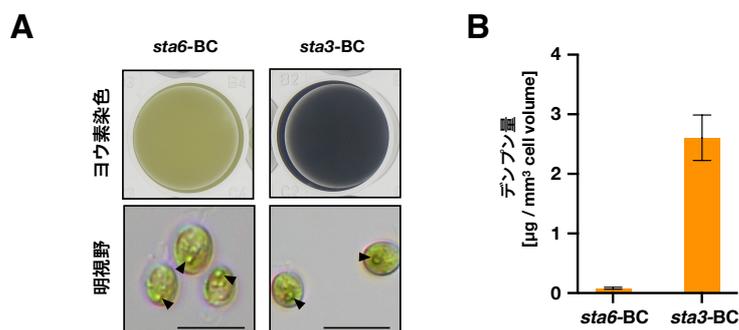


図 2-18. *sta6-BC*、*sta3-BC* 株のデンプンの蓄積レベル

(A) *sta6-BC*、*sta3-BC* 株におけるヨウ素染色によるデンプンの蓄積レベル。5% CO₂ 通気条件で培養した細胞を 0.04% CO₂ 通気条件に移して 24 時間後の細胞の抽出物を、ヨウ素液によって染色した (上段)。細胞培養液にヨウ素液を添加し、明視野で観察した (下段)。スケールバー：5 μm。

(B) *sta6-BC*、*sta3-BC* 株における細胞体積当たりのデンプン量。5% CO₂ 通気条件で培養した細胞を 0.04% CO₂ 通気条件に移して 24 時間後の細胞についてデンプンの定量測定を行った。実験は独立した 3 回以上の実験の平均値とその標準偏差を示す。

一方、*sta3-BC* ではアミロースを蓄積するため、ヨウ素液により暗紫色に呈色し、細胞体積あたりのデンプン量は $2.6 \pm 0.5 \mu\text{g mm}^{-3}$ を示した。これらの株について、ヨウ素液を滴下した細胞を明視野で観察したところ、*sta6-BC* ではデンプン鞘を形成しないため、デンプン鞘の染色は認められなかったが、*sta3-BC* ではデンプン鞘の染色が認められ、デンプン鞘を薄く形成することが示唆された (図 2-18A)。

sta6-BC および *sta3-BC* 株における CO₂ 濃度変化に応じた LCIB 局在パターンを調べるために、培養液中の CO₂ 濃度を測定しながら LCIB-Clover の細胞内局在を観察した (図 2-19A)。得られた画像から、LCIB-Clover 蛍光シグナルの CV 値を算出し、LCIB の局在パターンを定量化し (図 2-19B)、3 次元像を構築した (図 2-19C)。はじめに、明条件かつ 5% CO₂ 通気条件に順化させた条件では、*sta6-BC* と *sta3-BC* 株の CV 値はそれぞれ 0.87、1.00 と低い値を示し、LCIB-Clover は葉緑体中に分散した。次に、0.04% CO₂ 通気条件に移してから 12 時間後には、いずれの株においても培養液は 2.7–2.7 μM の超低 CO₂ 条件を示した。このとき、*sta3-BC* 株の CV 値は 1.51 に上昇し、LCIB は正常にピレノイド周囲へ集合したが、*sta6-BC* 株の CV 値は 1.07 と低いままで、4-D1 と同様に LCIB のピレノイド周囲への集合が遅延した。さらに 0.04% CO₂ 通気条件に移してから 24 時間後には、いずれの株においても培養液は 2.3–3.0 μM の超低 CO₂ 条件を維持した。このとき、*sta3-BC* 株の CV 値は 1.66 とわずかに上昇し、LCIB のピレノイド周囲のり

ング状の局在は維持された。また、*sta6*-BC 株の CV 値は 1.21 へ上昇したが、4-D1 と同様に葉緑体基底側に凝集する局在異常を示した。24 時間後における LCIB-Clover 蛍光の 3 次元構築画像より、*sta3*-BC 株では LCIB はピレノイドの周囲にグローブ状に局在し、*sta6*-BC 株では一箇所に凝集した (図 2-19C)。

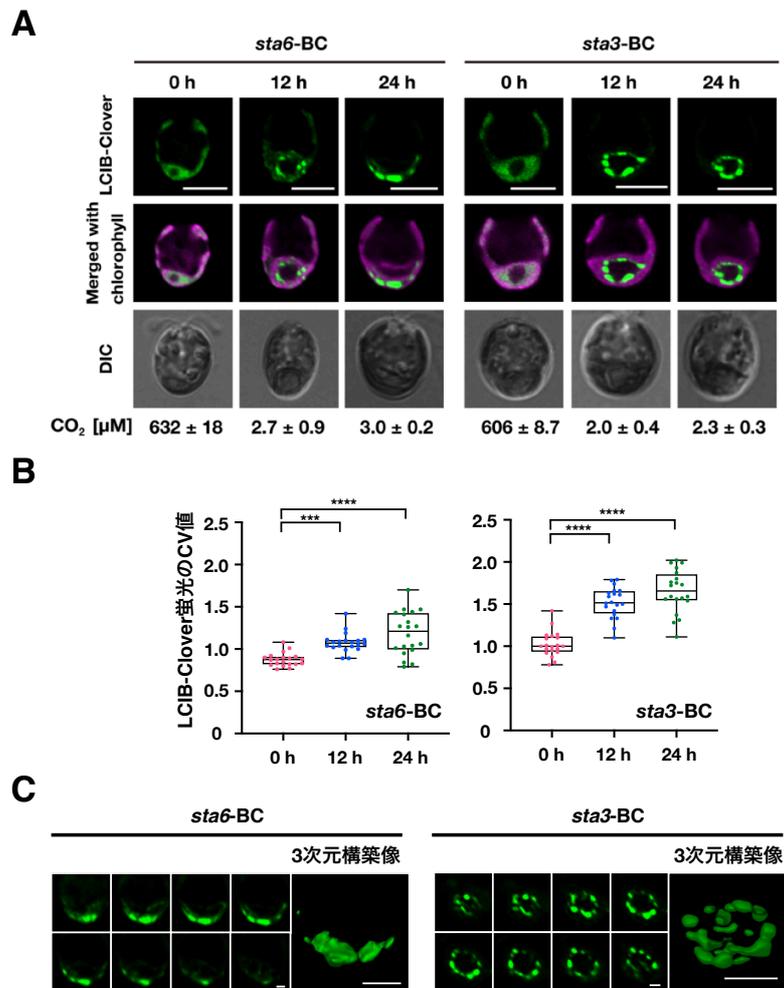


図 2-19. *sta6*-BC、*sta3*-BC 株における LCIB の細胞内局在

(A) *sta6*-BC および *sta3*-BC 株における経時的な LCIB-Clover 蛍光観察像。緑色は LCIB-Clover に由来する蛍光、マゼンタ色はクロロフィルに由来する自家蛍光を示し、中段にその重ね合わせ像を示す。明条件かつ 5% CO₂ 通気条件 (0 h) で培養した MBC-3 株の細胞を、培地交換後、0.04% CO₂ 通気条件に移して 12 時間、24 時間後の細胞について、LCIB 蛍光シグナルの局在変化を観察した。細胞培養液中の CO₂ 濃度をそれぞれの画像の下に示した。DIC：微分干渉像、スケールバー：5 μm。

(B) *sta6*-BC、*sta3*-BC 株における LCIB-Clover 蛍光の局在パターンを定量化。LCIB-Clover の局在を定量化するため、それぞれの細胞における LCIB-Clover 蛍光強度の変動係数 (CV 値) を算出した。CV 値は中央値と四分位範囲を示すエラーバーによって表す (n=19~20)。Kruskal-Wallis 法による分散分析を行った後、Dunn 法による多重比較検定を行い、異なる条件間の統計的有意差を評価した。*** *P* 値<0.001; **** *P* 値<0.0001。

(C) *sta6*-BC、*sta3*-BC 株における LCIB-Clover 蛍光の 3 次元構築。 (A) に示した明条件かつ 0.04% CO₂ 通気 24 時間後の細胞について、スタック画像とその 3 次元構築像を示す。

以上の結果から、ピレノイド周囲にデンプン鞘を形成しない3つの変異株(4-D1株、*sta11-1*株、*sta6-1*株)において、LCIBの局在異常が再現し、デンプン組成が異なるがデンプン鞘を薄く形成する2つの変異株(*sta2-1*株、*sta3-1*株)において、LCIBの正常な局在が認められたことから、ピレノイド周囲のデンプン鞘形成が、その厚みと組成に関係なくLCIBのピレノイド周囲への局在化に必要であることが示された。

5. デンプン合成変異株の生育と光合成特性

LCIBが欠損した変異株では超低CO₂条件で生育が遅延し、低CO₂条件で生育できない(Wang and Spalding 2006; Yamano et al., 2010)。デンプン鞘の欠損とLCIBの局在異常がCCMに与える影響を調べるため、スポットテストによる生育速度を比較した(図2-20)。いずれの株も、高CO₂条件では有意な差は認められなかったが、超低CO₂条件ではデンプン鞘を形成しない4-D1株および*sta11-1*株において、親株と比べて顕著な生育遅延が認められた。これとは対照的に、野生株と比べて薄いデンプン鞘を形成する*sta2-1*は超低CO₂条件でも正常に生育した。デンプン鞘欠損株において、LCIBの局在が異常を示す超低CO₂条件で生育が遅延したことから、デンプン鞘の形成とLCIBのピレノイド周囲への局在化がCCMの維持に必要である可能性が示唆された。

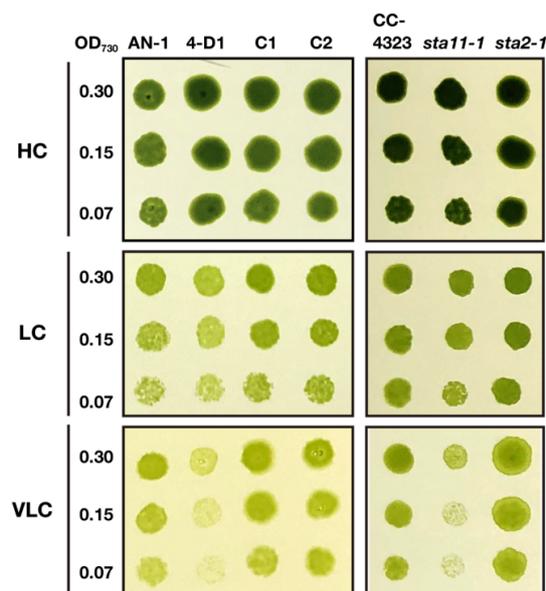


図 2-20. デンプン合成変異株における生育判定のためのスポットテスト

明条件かつ5%CO₂通気条件で培養した細胞を、OD₇₃₀が0.30, 0.15, 0.07になるよう調整した。細胞懸濁液3μLを炭素源を含まないMOPSP寒天培地に滴下し、連続白色光を照射しながら高CO₂(5%)条件、低CO₂(0.04%)条件でそれぞれ4日間、超低CO₂(0.01%)条件で5日間培養し、写真を撮影した。

4-D1 株と *stall-1* 株において、超低 CO₂ 条件で顕著な生育遅延が認められたことから、デンプン鞘形成が超低 CO₂ 条件における CCM に重要である可能性が示唆された。そこで、4-D1、*stall-1* および *sta2-1* 株の酸素発生速度を測定し、それぞれの親株と C_i への親和性を比較することで CCM を評価した (図 2-21)。0.04% CO₂ 通気条件で 12 時間または 24 時間後培養した AN-1、4-D1、C1 および C2 株について、酸素発生速度を比較すると、V_{max} 値には株間において顕著な差は見られなかったが (表 2-5)、4-D1 の K_{0.5}(C_i) 値は、AN-1、C1 および C2 株と比べて 1.4–1.7 倍高い値を示し、C_i 親和性の低下が認められた (図 2-21)。同様に、*stall-1*、*sta2-1*、およびこれらの親株 CC-4323 について、酸素発生速度を比較すると、*stall-1* では V_{max} 値は CC-4323 の 72–75% に低下し (表 2-5)、K_{0.5}(C_i) 値は 1.5–1.8 倍高い値を示した (図 2-21)。一方、*sta2-1* の V_{max} 値は顕著な差は見られず (表 2-5)、K_{0.5}(C_i) 値は、CC-4323 と比べて 1.2–1.3 倍高いだけで、C_i 親和性の低下が軽減された (図 2-21)。これらの結果から、厚みのあるデンプン鞘が、CCM 誘導時の C_i 親和性の維持に必要であることが示唆された。

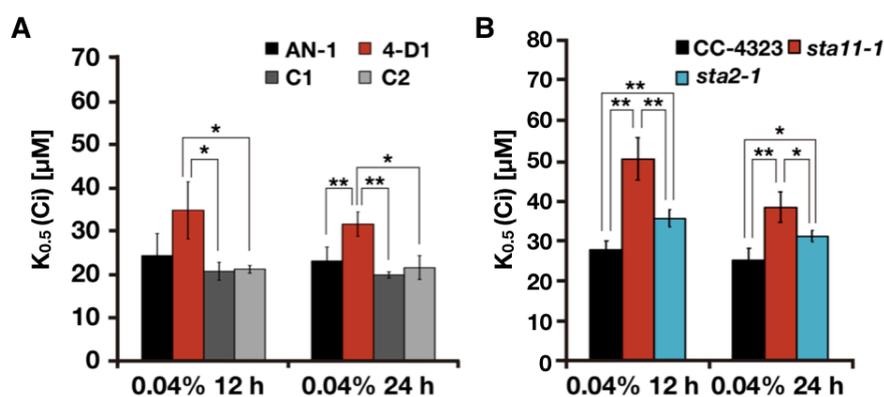


図 2-21. pH 7.8 での超低 CO₂ 条件におけるデンプン合成変異株の C_i に対する親和性

(A) AN-1、4-D1、C1、C2 株の超低 CO₂ 条件における C_i 親和性。5% CO₂ 通気条件で培養した細胞を 0.04% CO₂ 通気条件に移してから 12 時間、24 時間後の細胞を用いて酸素発生速度を測定し、K_{0.5}(C_i) を算出した。HEPES 緩衝液 (pH=7.8) を用いて測定した。黒色は AN-1 株、赤色は 4-D1 株、暗灰色は C1 株、薄い灰色は C2 株をそれぞれ示す。実験は独立した 3 回以上の実験の平均値とその標準偏差を示す。* P 値<0.05、** P 値<0.01。

(B) CC-4323、*stall-1*、*sta2-1* 株の超低 CO₂ 条件における C_i 親和性。5% CO₂ 通気条件で培養した細胞を 0.04% CO₂ 通気条件に移してから 12 時間、24 時間後の細胞を用いて酸素発生速度を測定し、K_{0.5}(C_i) を算出した。HEPES 緩衝液 (pH=7.8) を用いて測定した。黒色は CC-4323 株、赤色は *stall-1* 株、水色は *sta2-1* 株をそれぞれ示す。実験は独立した 3 回以上の実験の平均値とその標準偏差を示す。* P 値<0.05、** P 値<0.01。

表 2-5. 超低 CO₂ 条件 (pH 7.8) におけるデンブン合成変異株の最大酸素発生速度と Ci 親和性

株名	生育条件	V _{max} [μmol O ₂ mgChl ⁻¹ h ⁻¹]	K _{0.5} (Ci) [μM]
AN-1	0.04% CO ₂ 12 時間	216 ± 16	24 ± 5
	0.04% CO ₂ 24 時間	230 ± 10	23 ± 3
4-D1	0.04% CO ₂ 12 時間	219 ± 8	35 ± 7
	0.04% CO ₂ 24 時間	221 ± 20	32 ± 3
C1	0.04% CO ₂ 12 時間	254 ± 3	21 ± 2
	0.04% CO ₂ 24 時間	256 ± 5	20 ± 1
C2	0.04% CO ₂ 12 時間	212 ± 3	21 ± 1
	0.04% CO ₂ 24 時間	246 ± 10	22 ± 3
CC-4323	0.04% CO ₂ 12 時間	219 ± 16	28 ± 2
	0.04% CO ₂ 24 時間	241 ± 10	25 ± 3
<i>stall-1</i>	0.04% CO ₂ 12 時間	158 ± 23	51 ± 5
	0.04% CO ₂ 24 時間	182 ± 13	39 ± 4
<i>sta2-1</i>	0.04% CO ₂ 12 時間	191 ± 7	36 ± 2
	0.04% CO ₂ 24 時間	220 ± 2	31 ± 1

図 2-21.における最大酸素発生速度と Ci 親和性を示す。5% CO₂ 通気条件で培養した細胞を 0.04% CO₂ 通気条件に移してから 12 時間、24 時間後に、HEPES 緩衝液 (pH=7.8) を用いて酸素発生速度を測定した。実験は独立した 3 回以上の実験の平均値とその標準偏差を示す。

4-D1 における Ci 親和性の低下の原因を調べるために、ウェスタンブロッティングにより、CCM 関連タンパク質の蓄積量を調べた (図 2-22A)。まず、葉緑体包膜に局在する HCO₃⁻ 輸送体の LCIA、ピレノイドを構成するタンパク質である Rubisco の大サブユニット RbcL および Rubisco リンカータンパク質 EPYC1/LCI5、また LCIB と複合体を形成する相互作用因子 LCIC の蓄積量を調べたところ、いずれの株においても同程度の蓄積量を示した。しかし、細胞膜に局在する HCO₃⁻ 輸送体の HLA3 は、4-D1 株において蓄積が減少しており、相補株 (C1, C2) ではその蓄積が回復していた。4-D1 株における HLA3 の蓄積量の減少が、*HLA3* の遺伝子発現量の低下によるものかを調べるため、qRT-PCR を行った (図 2-22B)。このとき、低 CO₂ 誘導性遺伝子のコントロールとして *LCIA* の転写産物量も調べた。AN-1 株における *HLA3* と *LCIA* の転写産物量は、高 CO₂ 条件に順化した細胞では低く、超低 CO₂ 条件に移してから 20 分後に顕

著に上昇し、2時間後に減少する発現パターンを示した。4-D1株においても *HLA3* と *LCIA* の発現量は、AN-1株と同様の発現パターンを示し、発現量の有意な低下は認められなかったことから、*HLA3* の蓄積量の減少が転写レベルの制御ではなく、翻訳以降の過程で制御されていることが示唆された。以上の結果から、4-D1の Ci 親和性が低下した理由の一つに、*HLA3* の蓄積量の減少が関係することが示唆され、さらにデンプン鞘形成の欠損が CCM 関連因子の翻訳後調節に影響を及ぼす可能性が示唆された。

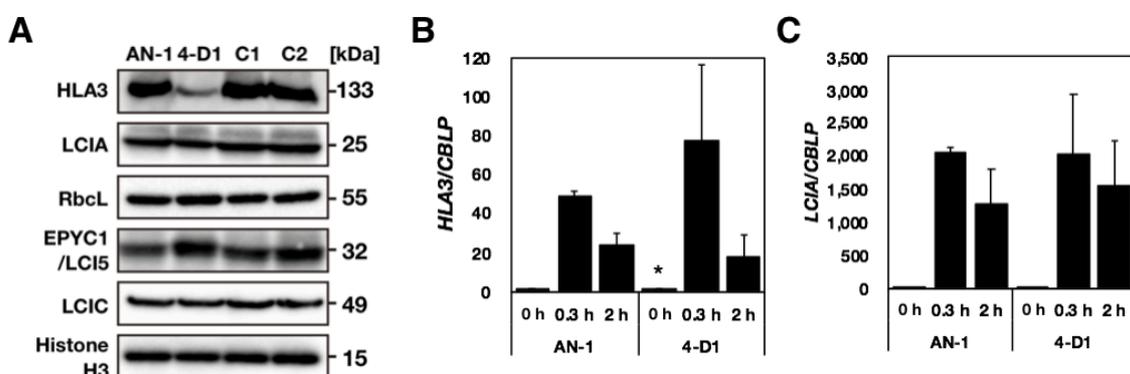


図 2-22. デンプン合成変異株における *HLA3* と *LCIA* の蓄積量と遺伝子発現量

(A) ウェスタンブロット解析による AN-1、4-D1、C1 および C2 株における CCM 関連因子の蓄積量。連続白色光を照射しながら 5% CO_2 通気条件で培養した細胞を、光条件を変えずに 0.04% CO_2 通気条件に移して 12 時間後の細胞からタンパク質を抽出した。Histone H3 はローディングコントロールに用いた。

(B) qRT-PCR による AN-1、4-D1 株における *HLA3* の相対的遺伝子発現量。恒常的に発現する G タンパク質 β サブユニットをコードする *CBLP* 内部標準遺伝子によって補正し、相対値を比較した。連続白色光を照射しながら 5% CO_2 通気条件で培養した細胞を (0 h)、光条件を変えずに 0.04% CO_2 通気条件に移してから 20 分 (0.3 h)、2 時間後 (2 h) の細胞を回収し、全 RNA を抽出した。実験は独立した 3 回以上の実験の平均値とその標準偏差を示す。Student's *t*-test により同条件における AN-1 株と 4-D1 株間の統計的有意差を評価した。*: P 値 < 0.05 を示す。

(C) qRT-PCR による AN-1、4-D1 株における *LCIA* の相対的遺伝子発現量。*CBLP* 内部標準遺伝子によって補正し、相対値を比較した。連続白色光を照射しながら 5% CO_2 通気条件で培養した細胞を (0 h)、光条件を変えずに 0.04% CO_2 通気条件に移してから 20 分 (0.3 h)、2 時間後 (2 h) の細胞を回収し、全 RNA を抽出した。実験は独立した 3 回以上の実験の平均値とその標準偏差を示す。Student's *t*-test により同条件における AN-1 株と 4-D1 株間の統計的有意差を評価した。

超低 CO_2 条件で 4-D1 株の Ci 親和性が低下した原因が *HLA3* の蓄積量の減少によるかどうかをさらに検討した。先行研究により、*HLA3* の挿入変異株は溶存 HCO_3^- 濃度が低い pH 6.2 において、 Ci 親和性が野生株と差がないことが示されている (Yamano et al., 2015)。そこで、*HLA3* の機能を無視できる pH 6.2 での酸素発生速度を測定したところ、いずれの株においても V_{max} 値の顕著な差は見られなかったが (表 2-6)、4-D1

株の $K_{0.5}(Ci)$ 値は、AN-1、C1 および C2 株と比べて 1.2 倍高い値を示し、pH 7.8 の結果（図 2-21）と比べると Ci 親和性の低下は緩和した（図 2-23）。この結果から、4-D1 株の Ci 親和性が低下した原因は、HLA3 の蓄積量の減少だけでなく、LCIB の局在異常およびデンブン鞘自身の欠損も関係する可能性が示唆された。

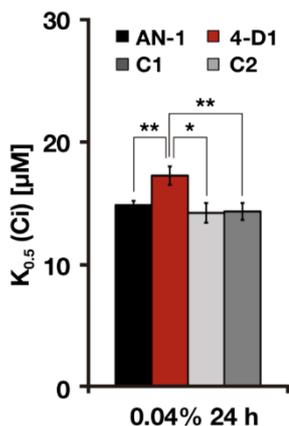


図 2-23. pH 6.2 での超低 CO_2 条件におけるデンブン合成変異株の Ci に対する親和性

pH 6.2 での超低 CO_2 条件におけるデンブン合成変異株の Ci 親和性。黒色は AN-1 株、赤色は 4-D1 株、暗灰色は C1 株、薄い灰色は C2 株をそれぞれ示す。連続白色光を照射しながら 5% CO_2 通気条件で培養した細胞を、光条件を変えずに 0.04% CO_2 通気条件に移してから 12 時間後に用いた。測定バッファーには MES 緩衝液 (pH=6.2) を用いた。独立した 3 回以上の実験の平均値とその標準偏差を示し、Student's *t*-test により異なる条件間の統計的有意差を評価した。*: P 値<0.05、**: P 値<0.01 を示す。

表 2-6. デンブン合成変異株とその親株における pH 6.2 での最大酸素発生速度と Ci 親和性

株名	生育条件	V_{max} [$\mu\text{mol O}_2 \text{ mgChl}^{-1} \text{ h}^{-1}$]	$K_{0.5}(Ci)$ [μM]
AN-1	0.04% CO_2 24 時間	237 ± 13	15 ± 1
4-D1	0.04% CO_2 24 時間	265 ± 12	17 ± 1
C1	0.04% CO_2 24 時間	244 ± 4	14 ± 1
C2	0.04% CO_2 24 時間	263 ± 2	14 ± 1

図 2-23 における最大酸素発生速度と Ci 親和性を示す。5% CO_2 通気条件で培養した細胞を 0.04% CO_2 通気条件に移してから 12 時間、24 時間後に、MES 緩衝液 (pH=6.2) を用いて酸素発生速度を測定した。実験は独立した 3 回以上の実験の平均値とその標準偏差を示す。

さらに、高 CO_2 条件では HLA3 は蓄積せず、LCIB の局在は分散することから、デンブン鞘欠損株における HLA3 の機能と LCIB の局在の影響を無視できる高 CO_2 条件で酸素発生速度を測定した（図 2-24）。AN-1、4-D1、C1 および C2 株では、 V_{max} 値の顕著な差は見られなかったが（表 2-7）、4-D1 株の $K_{0.5}(Ci)$ 値は、AN-1、C1 および C2 株と比べて 1.4-1.6 倍高い値を示した（図 2-24）。同様に、*stall-1* における V_{max} 値は CC-4323 の 76% に低下し（表 2-7）、 $K_{0.5}(Ci)$ 値は 1.7 倍高い値を示し、 Ci 親和性の低下が認められた（図 2-24）。この結果から、デンブン鞘欠損株の Ci 親和性が低下した原

因は、HLA3 の蓄積量の減少および LCIB の局在異常だけでなく、デンプン鞘自身の欠損も関係する可能性が示唆された。

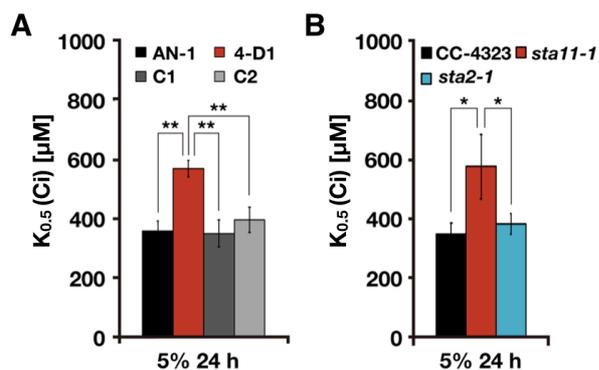


図 2-24. pH 7.8 での高 CO₂ 条件におけるデンプン合成変異株の C_i に対する親和性

(A) AN-1、4-D1、C1、C2 株の高 CO₂ 条件における C_i 親和性。5% CO₂ 通気条件で 24 時間以上培養した細胞を用いて酸素発生速度を測定し、 $K_{0.5}(C_i)$ を算出した。HEPES 緩衝液 (pH=7.8) を用いて測定した。黒色は AN-1 株、赤色は 4-D1 株、暗灰色は C1 株、薄い灰色は C2 株をそれぞれ示す。実験は独立した 3 回以上の実験の平均値とその標準偏差を示す。* P 値<0.01。

(B) CC-4323、*stall1-1*、*sta2-1* 株の超低 CO₂ 条件における C_i 親和性。5% CO₂ 通気条件で 24 時間以上培養した細胞を用いて酸素発生速度を測定し、 $K_{0.5}(C_i)$ を算出した。HEPES 緩衝液 (pH=7.8) を用いて測定した。黒色は CC-4323 株、赤色は *stall1-1* 株、水色は *sta2-1* 株をそれぞれ示す。実験は独立した 3 回以上の実験の平均値とその標準偏差を示す。* P 値<0.05、** P 値<0.01。

表 2-7. 高 CO₂ 条件 (pH 7.8) におけるデンプン合成変異株の最大酸素発生速度と C_i 親和性

株名	生育条件	V_{max} [μmol O ₂ mgChl ⁻¹ h ⁻¹]	$K_{0.5}(C_i)$ [μM]
AN-1	5% CO ₂ 24 時間	269 ± 6	361 ± 33
4-D1	5% CO ₂ 24 時間	283 ± 14	571 ± 29
C1	5% CO ₂ 24 時間	271 ± 24	352 ± 45
C2	5% CO ₂ 24 時間	210 ± 23	398 ± 43
CC-4323	5% CO ₂ 24 時間	233 ± 6	350 ± 36
<i>stall1-1</i>	5% CO ₂ 24 時間	179 ± 32	579 ± 109
<i>sta2-1</i>	5% CO ₂ 24 時間	234 ± 8	384 ± 34

図 2-24. における最大酸素発生速度と C_i 親和性を示す。5% CO₂ 通気条件で培養して 24 時間後に、HEPES 緩衝液 (pH=7.8) を用いて酸素発生速度を測定した。実験は独立した 3 回以上の実験の平均値とその標準偏差を示す。

考察

1. LCIB の局在変化は溶存 CO₂ 濃度に依存する

先行研究より LCIB は培地に通気する CO₂ 濃度の変化に伴い、局在変化することが示されていた (Yamano et al., 2010)。本研究では、局在観察時に GC により培養液中の Ci 濃度を測定し、培地の pH を変えて LCIB の局在観察を行うことで、LCIB の局在変化が培養液中の Ci 濃度および HCO₃⁻濃度ではなく、CO₂ 濃度に依存することを明らかにした。さらに、LCIB の局在パターンを CV 値によって定量化することで、溶存 CO₂ 濃度が 6.5 μM 以下のとき、LCIB はピレノイド周囲に集合することを示した。これは、LCIB の機能によって定義された超低 CO₂ 条件 (<7 μM; Wang and Spalding, 2014a) と一致したことから、LCIB の機能と局在変化の関連性が示された。

先行研究における DCMU と CHX の添加実験ならびに暗所での LCIB の局在観察から、分散した LCIB がピレノイドへ再集合するためには、光合成、CCM の誘導、明条件でのタンパク質の新規合成が必要であると考えられていた (Yamano et al., 2010, Yamano et al., 2014)。しかし本研究により、LCIB がピレノイドへ再集合するためには、細胞があらかじめ明条件かつ超低 CO₂ 条件を誘導する必要があること、また LCIB 自身が CO₂ 濃度の低下に応答して葉緑体内を移動することを初めて示した。LCIB がピレノイド周囲へと局在化するために、あらかじめ明条件かつ超低 CO₂ 条件を誘導する必要性がある理由として、デンブンプ構造の必要性が考えられる。明条件かつ超低 CO₂ 条件ではデンブンプは発達するが、暗条件または高 CO₂ 条件ではデンブンプ形成が阻害される (Kuchitsu et al., 1988)。デンブンプが欠損すると、LCIB はピレノイド周囲への局在化が遅延し、リング状に局在化できないことから、LCIB のピレノイド周囲への局在化には、あらかじめ明条件かつ超低 CO₂ 条件においてデンブンプが形成されている必要性が考えられる。

さらに、LCIB がピレノイド周囲へと局在化するために、あらかじめ明条件かつ超低 CO₂ 条件を誘導している必要がある理由について、2 通り議論する。一つ目は、CCM 関連タンパク質の蓄積の必要性である。図 2-6A および図 2-6B において、それぞれ暗条件へ 2 時間、高 CO₂ 通気条件へ 1 時間移すことで LCIB を分散させたが、先行研究により、明条件かつ低 CO₂ 誘導性の CCM 関連タンパク質が両条件において分解されずに蓄

積量を維持されることが示されている (Yamano et al., 2014; 佐藤江美、山野隆志、福澤秀哉: 未発表データ)。このことから、LCIB がピレノイドへ再集合するためには、CCM 関連タンパク質の蓄積が必要である可能性が考えられる。二つ目は、未知の細胞骨格構造の必要性である。LCIB が葉緑体中を移動する機構は明らかにされていないが、明条件かつ超低 CO₂ 条件において、LCIB の移動に関わる未知の細胞骨格構造の形成が必要である可能性が考えられる。

lcib 変異株の F₂ 子株である 99-4 株では、5% CO₂ および 0.04% CO₂ 通気条件に順化した両方の条件で、最大酸素発生速度 V_{max} と C_i への親和性が C9 株および MBC-3 株と比べて有意に低下していた。高 CO₂ 条件でも LCIB は低レベルに蓄積し (図 2-2C)、葉緑体中に分散していることから、LCIB が高 CO₂ 条件においても低 CO₂ 条件 (図 1-7) と同様に、葉緑体ストロマへ流入した CO₂ を HCO₃⁻に変換することで、間接的な CO₂ 取り込みを担う可能性が示唆された。

2. デンプン鞘形成は CCM に必要である

本研究では、LCIB がピレノイド周囲に局在化するために必要な因子を明らかにするため、LCIB の局在異常株を単離・解析し、デンプン鞘形成が LCIB の局在化と CCM に必要であることを明らかにした。先行研究により、デンプン鞘を形成しない *isal* アリル変異株 *BAFJ-6* の酸素発生速度が測定されたが、光合成における C_i 親和性は、野生株の *cw-15* 株と比べて有意な差が認められなかったことから、デンプン鞘形成は CCM に関与しないと考えられてきた (Villarejo et al., 1996)。しかし、*BAFJ-6* の表現型はその親株である CC-125 と比較されていなかった点や、相補株を用いた解析が行われなかったため、本研究で示された 1.4 倍程度の $K_{0.5}(C_i)$ 値の差が見逃された可能性が考えられる。一方で、*isal* アリル変異株 *sta7-10* では、親株の野生株 CC-425 と比べてわずかに酸素発生速度が低下することが示されていたが、CCM との関連性については調べられていなかった (Posewitz et al., 2004)。本研究では、複数のデンプン鞘形成異常株について酸素発生速度を測定し、親株および相補株の表現型と比較することで、デンプン鞘の形成が超低 CO₂ 条件における LCIB のピレノイド周囲への局在化と C_i 親和性の維持に必要であることを明らかにした。今後は、緑藻に共通して保存されるデンプン鞘の形成が、他の

種でも CCM の維持に関わるかについて調べる必要がある。過去に、緑藻 *Chlorella pyrenoidosa* のデンプン鞘欠損株についても、酸素発生速度は野生株と比較して差が無いことが報告されたが、こちらも親株あるいは相補株を用いた比較が行われておらず、再検討の必要性が示唆された (Plumed et al., 1996)。

4-D1 と *stall-1* 株は、超低 CO₂ 条件だけでなく高 CO₂ 条件においても Ci への親和性の低下が認められた(図 2-24)。デンプン鞘は CO₂ 濃度の低下に伴い発達するが(Kuchitsu et al., 1988; Ramazanov et al., 1994)、高 CO₂ 条件に移した細胞でも TEM 観察像によってデンプン鞘構造が観察されている (Kuchitsu et al., 1988; Mackinder et al., 2016)。デンプン鞘が完全に消失するためには、高 CO₂ 条件に移してから 72 時間の長時間を要することが示されている (Ramazanov et al., 1994)。また、高 CO₂ 条件に順化した細胞に光合成電子伝達阻害剤 DCMU あるいは脱共役剤 FCCP を添加すると、細胞内の Ci プールが減少することから、高 CO₂ 条件においても CO₂ 濃縮能を持つことが、生理学的な実験によって示されている (Badger et al., 1980)。近年、デンプン鞘の形態が異常を示す *sagal* 変異株が単離され、*sagal* 変異株は高 CO₂ と CO₂ 欠乏条件の両条件で、酸素発生速度の低下を示した (Itakura et al., 2019)。これらの知見から、デンプン合成およびデンプン鞘形成は、CO₂ 欠乏条件と高 CO₂ 条件の両条件において、ピレノイド内部の Rubisco 周囲へ CO₂ を濃縮する役割を担う可能性が考えられる。

厚みのあるデンプン鞘は、ピレノイドから漏れ出る CO₂ の拡散を制限する物理的な障壁の役割を担う可能性だけでなく、葉緑体ストロマに接するチラコイド膜上で発生した O₂ が、ピレノイド内の Rubisco のカルボキシラーゼ活性を阻害することを防ぐ役割を担う可能性も考えられる。このような O₂ を排除する機構は、チラコイド膜がピレノイドに貫入したピレノイドチューブに酸素発生型の光化学系 II が存在しない事実や (McKay and Gibbs, 1991)、ピレノイドが液-液相分離して Rubisco の基質となる CO₂ と RuBP をドロプレットの内部に隔離し O₂ を排除するモデルと整合性がある。デンプン鞘の形成によって、O₂ 発生部位と CO₂ 固定部位を空間的に分離することで、Rubisco のオキシゲナーゼ反応を抑制し、カルボキシラーゼ反応を促進する可能性が考えられる。これにより、光呼吸によるエネルギー損失を効率的に抑えることができると考えられる。

4-D1 株において、HLA3 の蓄積レベルの低下が認められたが、*HLA3* 遺伝子発現量に

差は無かったため、4-D1 株では HLA3 が翻訳後修飾あるいはタンパク質の分解を受けている可能性が示唆された (図 2-22A,B)。デンプン鞘が欠損すると、ピレノイド周囲における CO₂ のバリア機能が損なわれ、葉緑体内の CO₂ 濃度勾配が変化すると考えられる。このことから、HLA3 の蓄積量が細胞内の CO₂ 濃度環境によって調節される可能性が考えられる。

3. デンプン鞘形成は LCIB のピレノイド周囲への局在化に必要である

超低 CO₂ 条件において、デンプン鞘形成が LCIB のピレノイド周囲への局在化に寄与する仕組みについて議論する。光照射下で 5% CO₂ 通気条件から 0.04% CO₂ 通気条件へと移すと、5-6 時間後にピレノイド周囲のデンプン鞘の発達が完了し、また、LCIB のピレノイドへの局在化も 6 時間後に完了する (Kuchitsu et al., 1988; Ramazanov et al., 1994; Yamano et al., 2010)。CO₂ 濃度の低下に伴うデンプン鞘の発達と LCIB のピレノイドへの局在化のタイミングが一致することから、ピレノイド周囲のデンプン鞘は、LCIB がピレノイド周囲に局在するための足場として機能する可能性が考えられる。そのため、デンプン鞘が欠損した株では、超低 CO₂ 条件に移すと LCIB は遅れてピレノイド周囲に集合するが、ピレノイド周囲にリング状に配置できず、葉緑体基底側に凝集したと考えられる。

LCIB および LCIC はいずれも葉緑体ストロマ中に可溶性タンパク質として存在し、デンプン結合ドメインを持たない (Yamano et al., 2010)。そのため、LCIB/LCIC 複合体がデンプン鞘に直接結合する可能性は低く、未知のリンカータンパク質を介して LCIB/LCIC 複合体がデンプン鞘の外側に配置される可能性が考えられる。近年、デンプン結合モチーフ (carbohydrate-binding module family 20; CBM20) を持つ SAGA1 がデンプン鞘の内側に結合し、デンプンプレートの端側のデンプンプレートの伸長を抑えることで、厚みのあるデンプン鞘形成を調節するモデルが提唱された (Itakura et al., 2019)。このように、LCIB/LCIC 複合体もデンプン結合モチーフを持つ未知因子を介してデンプン鞘の外側に局在する可能性がある。例えば、CBM48 を持つ starch branching enzyme 3 (SBE3) と、CBM20 を持つ low-CO₂-inducible protein 9 (LCI9) は、ピレノイド周囲に局在することが示されており (Mackinder et al., 2017)、これらが LCIB とデンプン鞘のリンカーの役割を持つ可能性がある。さらに、ISA1 自身も CBM48 を持つため、LCIB

とデンプン鞘のリンカーとして働く可能性がある。ISA1 の N 末端には予測葉緑体移行シグナルが存在することから、葉緑体に局在すると予測されており (ChloroP; Emanuelsson et al., 1999)、ピレノイドのプロテオーム解析によっても検出されている (Zhan et al., 2018)。ピレノイドの液-液相分離の特性により、質量が大きいタンパク質を排除し、ピレノイド内部に局在するタンパク質は 80 kDa 未満に限定される (Updike et al., 2011; Mackinder et al., 2017)。そのため、ISA1 (91 kDa) はピレノイドマトリックスから排除され、ピレノイドの外側に局在する可能性がある。本研究では、ISA1 の細胞内局在を調べるため、4-D1 株へ ISA1-CrmCHERRY-3FLAG 発現コンストラクトを形質転換したが、CrmCHERRY 由来の蛍光シグナルは検出されなかった。また、*isal* のアレル変異株である *BAFJ-6* 株 (Ball et al., 1991) へ LCIB-Clover コンストラクトの形質転換を試みたが、形質転換効率が低く、形質転換体は取得できなかった。さらに、*BAFJ-6* 株において抗 LCIB 特異抗体を用いた間接的免疫蛍光染色も試みたが、*BAFJ-6* 株の細胞は poly-L-lysine 処理されたスライドガラスに接着できない性質を示し、観察が困難であった。今後、C1 および C2 株において抗 FLAG 特異抗体を用いることで、ISA1-CrmCHERRY-3FLAG 融合タンパク質を標的とした間接的免疫蛍光染色などの方法で ISA1 の細胞内局在を調べる必要がある。

近年、インタラクトーム解析により、LCIB の相互作用因子としてベストロフィン様タンパク質 BST1、BST-2、BST-3 が同定された (Mackinder et al., 2017; Mukherjee et al., 2019)。クラミドモナスのベストロフィン様タンパク質は 4 つの膜貫通ドメインを持ち、シロイヌナズナのクロライドチャネル AtVCCN1 のアミノ酸配列と 30% の類似度を示す (Mukherjee et al., 2019)。さらに、ベストロフィン様タンパク質はチラコイド膜に局在し、ピレノイドを除く葉緑体領域に比べて特にピレノイド近傍に 1.46 倍多く局在することが示された (Mukherjee et al., 2019)。しかし、LCIB のピレノイド周囲の局在化にこれらのタンパク質が関わっているかどうかについては不明である。3 つのベストロフィン様タンパク質の機能が冗長的であることが示唆されていることから (Mukherjee et al., 2019)、これらの三重変異体を作成して LCIB の局在観察を行うことで、LCIB の局在との関連性を明らかにできると考えられる。

デンプン鞘が、LCIB がピレノイド周囲へ局在化する足場の役割を持つとすれば、ピ

レノイド周囲に局在する LCIB 以外のタンパク質についても、デンプン鞘を足場となる可能性が考えられる。今後、デンプン鞘の欠損株において、LCIB と LCIC 以外のピレノイド近傍に局在するタンパク質 (Mackinder et al., 2017) についても、その局在が正常に維持されるかどうかについて明らかにする必要がある。

4. 4-D1 株における *ISA1* 遺伝子発現量

先行研究により、*ISA1* アリル変異株である *sta7-1* では、光独立栄養条件で培養した場合には、電子顕微鏡観察により、ストロマデンプン粒とピレノイド周囲のデンプン鞘は形成されなかったのに対して (Mouille et al., 1996)、本研究で単離した 4-D1 株では、ピレノイド周囲にデンプン鞘の代わりに小さいデンプン粒が観察されたことから、4-D1 株において *ISA1* 遺伝子発現が完全に抑制されていない可能性を考えた。しかし、4-D1 株において *aadA* カセットは 536 番目のアミノ酸配列の位置に挿入しており (図 3-1)、*ISA1* の機能に重要な α -アミラーゼ触媒ドメインの機能が損なわれている可能性が高い。さらに、ゲノミック PCR の結果より、*aadA* カセットの挿入により染色体の乗り換えが起きていることも予想されている (図 2-10B)。4-D1 株においてピレノイド周囲に小さいデンプン粒が観察された理由として、CO₂ 欠乏条件の誘導時間や細胞密度などの培養条件の違い、あるいは親株の違いによる可能性が考えられる。



図 3-1. Isoamylase1 (*ISA1*) のアミノ酸配列および機能ドメイン

ISA1 遺伝子に *aadA* カセットが挿入された位置に相当するアミノ酸残基を赤色の数字で示す。cTP: 葉緑体移行シグナル、CBM_48: Carbohydrate-binding module 48 (糖結合モジュール)、Alpha amylase: α -アミラーゼ触媒ドメイン。

5. デンプン合成阻害が光合成に与える影響

陸生植物では、シンク器官 (貯蔵組織など) における炭水化物の蓄積を促進すると、転流により、ソース器官 (葉) における光合成は促進される。一方で、ソース器官 (葉) における炭水化物の蓄積は、光合成を抑制する (Paul and Foyer 2001)。シロイヌナズナの ADP-グルコースピロホスホリラーゼ変異体では、野生株と比べて光合成能力が低

下することが示されており、これはデンプン合成が抑制され、トリオースリン酸が利用されないことが、光合成のネガティブフィードバックを引き起こすと考えられている (Sun et al., 1999)。さらに、葉にデンプンが蓄積すると、物理的に CO₂ の拡散が制限され、光合成が低下することが示唆されている (Paul and Foyer, 2001)。このように、陸生植物では光合成と炭水化物のシンク・ソースバランスは厳密に調節されていることが知られているが、緑藻クラミドモナスにおける、デンプン合成による光合成のフィードバックの知見はほとんど知られていない。4-D1 株は C_i への親和性が低下していたが、V_{max} は AN-1 株と同程度の値を示した (表 2-5)。従って、4-D1 株では CCM の活性が低下しているものの、デンプン合成阻害による光合成のネガティブフィードバックは生じていないと考えられる。興味深いことに、C2 株では AN-1 と比べてデンプン鞘面積が上昇し (図 2-13)、C1 と C2 株において、V_{max} 値が AN-1 および 4-D1 株と比べて有意に上昇した (表 2-5)。この理由として、AR プロモーターによる ISAI 遺伝子の過剰発現により、デンプン合成が促進され、デンプンの蓄積量が上昇したことにより、光合成能力が上昇した可能性が考えられる。

6. ピレノイド周囲における CO₂ リサイクルモデル

本研究は、ピレノイド周囲のデンプン鞘が CCM における C_i 親和性の維持に必要であることを示した。最近、LCIB/LCIC 複合体とベストロフィン様タンパク質が協調してピレノイド周囲における CO₂ のリサイクルに関わるモデルが提唱された (Mukherjee et al., 2019)。過去の抗 LCIB 特異抗体を用いた免疫電子顕微鏡像により、チラコイド膜が貫入するデンプン鞘の隙間 (約 100 nm; 図 1-1E; Engel et al., 2015) 近傍に、LCIB が局在するように観察される (図 1-8; Yamano et al., 2010)。これらのことから、野生型クラミドモナスにおけるピレノイド周辺の CO₂ のリサイクル機能について、以下のモデルを考えた (図 3-2A)。まず、デンプン鞘が物理的な障壁となってピレノイドから CO₂ が漏れ出ることを防ぐ。しかし、デンプン鞘にはチラコイド膜が陥入するための間隙が存在する。そこで、その隙間に密に局在する LCIB/LCIC 複合体が、デンプン鞘の間隙を通過してピレノイドから漏れ出た CO₂ を HCO₃⁻へと変換する。変換された HCO₃⁻はベストロフィン様タンパク質の働きにより、再びチラコイド膜ルーメンへと取り込まれる。最後に、チラコイド膜ルーメンに局在する炭酸脱水酵素 CAH3 によって CO₂ へと変換

され、ピレノイドマトリックスへCO₂が供給される。

一方、デンプン鞘の欠損株では、デンプン鞘によるCO₂のバリアとしての機能が失われただけでなく、LCIBが葉緑体基底側で凝集するため、CO₂のリサイクルの機能の一部も失われ、C_iへの親和性が低下すると考えられる(図3-2B)。今後は、デンプン鞘形成は正常で、LCIBの局在のみが異常を示す変異株を取得することにより、デンプン鞘によるバリアとLCIB/LCIC複合体によるリサイクルのどちらがよりCCMに貢献するかについて明らかにできると考えられる。

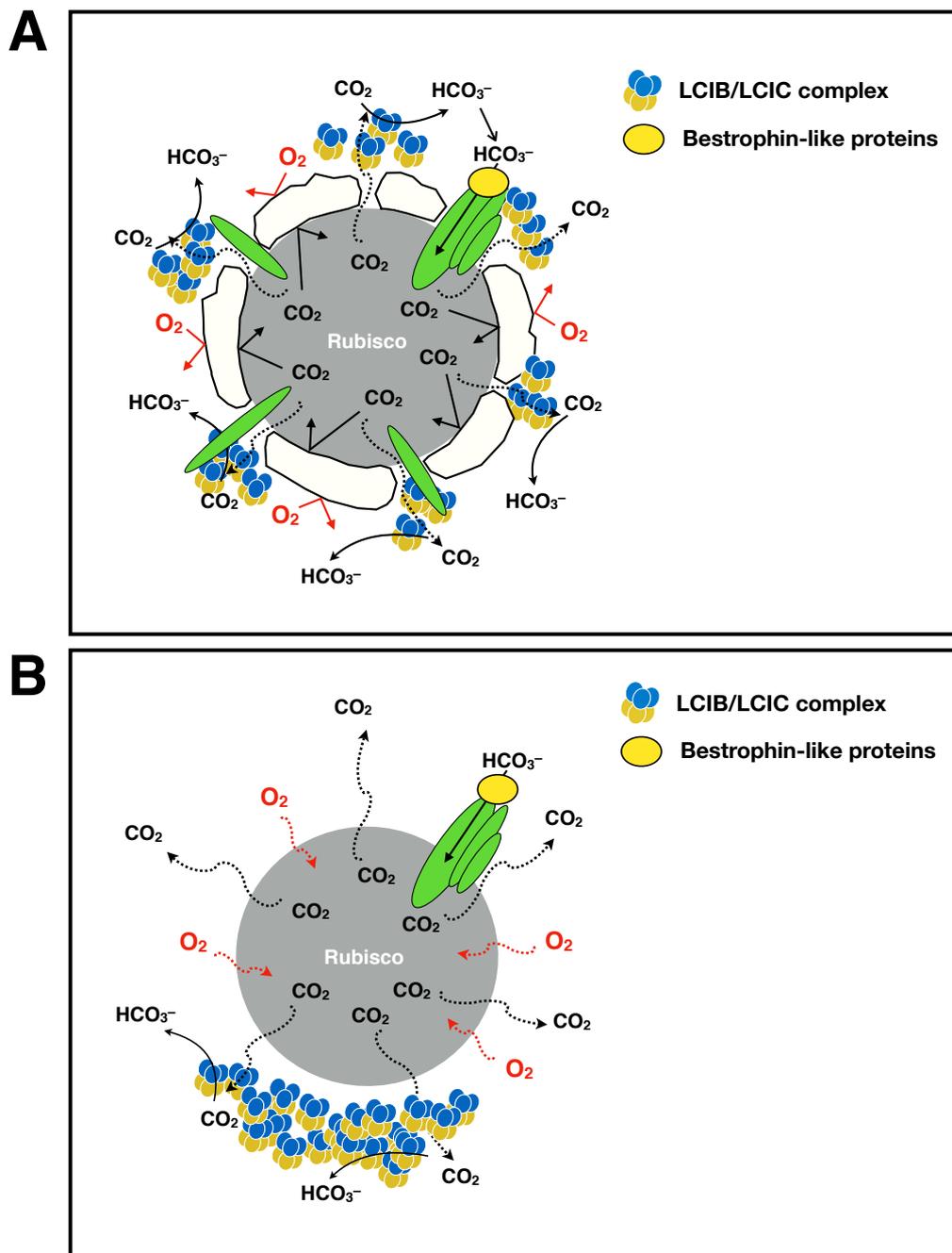


図 3-2. 超低 CO_2 条件におけるピレノイド周辺における CO_2 のバリア・リサイクル機構

(A) 野生株における CO_2 のバリア・リサイクル機構。(1)デンブロン鞘が物理的なバリアの役割により、ピレノイドから CO_2 が漏れ出ることと O_2 がピレノイドへと侵入することを防ぐ。(2)デンブロン鞘の間隙を通過してピレノイドから漏れ出した CO_2 は、LCIB/LCIC 複合体により HCO_3^- へと変換される。(3)LCIB/LCIC 複合体によって変換された HCO_3^- は、ベストロフィン様タンパク質により、再びチラコイド膜ルーメンへと取り込まれる。(4)チラコイド膜ルーメンに輸送された HCO_3^- は、炭酸脱水酵素 CAH3 によって CO_2 へと変換され、ピレノイドマトリックスへ CO_2 が供給される。

(B) デンブロン鞘欠損株における CO_2 のバリア・リサイクル機構。デンブロン鞘の欠損により、ピレノイドのバリアとしての機能が失われるため、ピレノイドから CO_2 が漏れ出てしまい、ピレノイドへと O_2 が侵入する。さらに、LCIB の局在異常により、リサイクルの機能も一部失われる。

7. LCIB がピレノイド周囲に集合する機構

本研究により、デンプン鞘が LCIB のピレノイド周囲への正常な局在化に必要であることが明らかになったが、LCIB が CO₂ 濃度の低下に伴いピレノイドへと移動する機構は不明である。デンプン鞘の欠損株においても、葉緑体中に分散した LCIB-Clover シグナルは葉緑体基底側へと移動したことから、LCIB はデンプン鞘形成に関係なく、CO₂ 濃度変化に応答することが示された。CCM が駆動する間、Ci プールはピレノイド内部とその近傍に維持されるため、ピレノイド周囲の CO₂ 濃度は葉緑体全体と比べて相対的に高いと考えられる。これを考慮すると、LCIB 自身が、または LCIC などの LCIB の相互作用因子が CO₂ 濃度の高い場所へ向かって局在する性質を持つ可能性が考えられる。デンプン鞘が欠損した変異株では、ピレノイドから CO₂ が漏れ出るため、ピレノイド近傍の Ci プールが維持されず、葉緑体中の CO₂ 濃度勾配の変動が遅れ、結果として LCIB のピレノイド周囲への局在化が遅延した可能性が考えられる (図 2-14; 図 2-17; 図 2-19)。さらに、CHX 添加により新規タンパク質合成を阻害しても、LCIB は CO₂ 濃度の低下に伴いピレノイド周囲へと局在変化することから、LCIB の局在変化が LCIB の分解と再合成によるものではなく、LCIB 自身が移動することが示された (図 2-6A)。

本研究では、順遺伝学的なタンパク質局在異常株のスクリーニングをきっかけとして、CCM におけるデンプン鞘の役割を明らかにした。このことは、表現型観察による変異株スクリーニングが新規の CCM 因子や制御機構を明らかにするために依然として重要であることを示している。一方で、変異株スクリーニングのプロセスにおいて律速となる作業が、目的の表現型を持つ細胞の「選抜」であり、時間を要する作業が表現型の「記述」である。近年、大規模かつ超高速な変異株スクリーニング技術 (画像活性型細胞選抜法: intelligent image-activated cell sorting; iIACS) が開発され、1 秒間に 100 個以上の細胞を観察しながら、その内部の分子構造や形態などの様々な空間的情報を深層学習により判断し、興味ある細胞を 1 つずつソーティングすることができるようになった (Nitta et al. Cell 2018)。例えば、LCIB-Clover 蛍光の CV 値のリアルタイム計算に基づき、従来手法よりも約 6,500 倍の速さで LCIB の局在異常株のスクリーニングすることに成功している (図 3-3)。今後は、このような技術を用いることで、LCIB のみならず他の CCM 関連タンパク質の局在異常株を選抜することが可能となるだろう。ひいては、

CCM 関連タンパク質の網羅的な局在ネットワークが CCM の駆動と制御に与える影響について調べることが可能となると期待される。

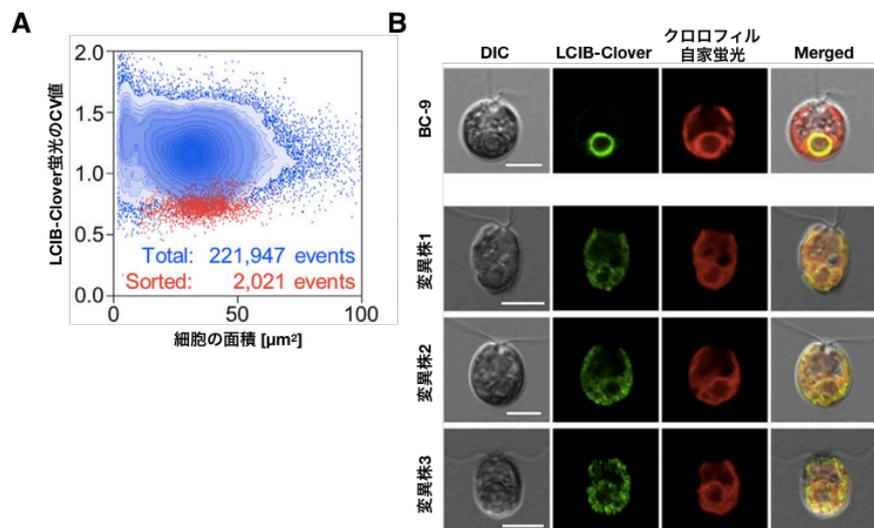


図 3-3. intelligent image-activated cell sorting (iACS) を用いた LCIB 局在異常株の超高速スクリーニング

(A) 細胞集団から選抜された変異株の CV 値散布図。発現株を用いた青色はソーティングされなかった細胞集団のイベント数を、赤色はソーティングされた細胞集団のイベント数を示す。

(B) BC-9 株と単離した LCIB 局在異常株の共焦点顕微鏡像。緑色は LCIB-Clover に由来する蛍光、赤色はクロロフィルに由来する自家蛍光を示し、右列にその重ね合わせ像を示す。BC-9 株：C9 株に LCIB-Clover を発現させた株。変異株 1,2,3：BC-9 株へパロモマイシンに耐性を付与する *AphVIII* 遺伝子カセットをランダムに挿入し取得した変異株。炭素源を含まない TP 培地で光独立栄養条件に移してから 12 時間後の細胞を観察した。DIC：微分干渉像、スケールバー：5 μm 。

結論

本研究により、LCIB のピレノイド周囲への局在変化は、培地中の溶存 HCO_3^- 濃度ではなく溶存 CO_2 濃度の低下に依存することが明らかになった。また、LCIB がピレノイド周囲に局在変化するためには CO_2 濃度の低下のみでは不十分であり、あらかじめ細胞を明条件かつ超低 CO_2 条件に 6 時間以上処理している必要があることが判明した。さらに、LCIB がピレノイド周囲へ局在化するためにはタンパク質の新規合成は必要なく、LCIB 自身が葉緑体内を移動することが示唆された。

これまで役割が明確でなかったピレノイド周囲に形成されるデンプン鞘が、LCIB のピレノイド周囲への局在化と CCM の駆動に伴う超低 CO_2 条件における C_i 親和性の維持に必要であることが明らかになった。

実験材料及び方法

使用株と培養条件

本研究に用いた *Chlamydomonas reinhardtii* の株名と遺伝子情報を表 3-1 に示す。CCM 及び光合成が正常な野生株として、CC-5325 株 (mt^-)、CC-4323 株 (mt^-)、C9 株 (mt^-)、CC-1690 株 (mt^+) を使用した。C9 株は国立環境研究所の微生物系統保存施設 (<https://mcc.nies.go.jp/index.html>) に NIES-2235 株として保存されている。その他、CC-5325 株 (mt^-)、CC-4323 株 (mt^-)、*sta2-1* 株 (mt^- , *sta2*)、*sta3-1* 株 (mt^- , *sta3*)、*sta6-1* 株 (mt^+ , *cw15*, *arg7*, *sta2*)、*sta7-1* 株 (mt^+ , *cw15*, *arg7*, *sta7*) および *sta11-1* 株 (mt^- , *sta11*) は、*Chlamydomonas* resource center から取り寄せた。*lcib* 変異株 (LMJ.RY0402.173287) は、挿入変異株ライブラリー CLiP (Li et al., 2016) より取り寄せ、B1 株 (mt^- , *lcib*, *aphVIII*) と名付けて使用した。クラミドモナス株の維持には、固形あるいは液体の Tris-acetate-phosphate 培地 (TAP 培地; Harris, 1989) を用いて混合栄養条件にて培養した。光合成活性測定や局在観察等、全ての生理学実験時の光独立栄養条件での培養には、炭素源を含まない phosphate 培地に 20 mM の MOPS (pH 7.0) を添加した MOPSP 培地を用いた。

生理学的実験に用いた細胞は、5 mL の TAP 培地で 12 時間以上前培養した後、50 mL MOPSP 培地で、5 % CO₂ を含む空気を通気して 24 時間培養した。細胞は遠心分離し (600×g, 5 分, 25°C)、ペレットを 50 mL MOPSP 培地に再懸濁し、5% CO₂、0.04% CO₂、0.12% CO₂、0.01% CO₂ あるいは 0.001% CO₂ を含む空気を通気して培養した。0.04% の CO₂ を含む空気は、エアーコンプレッサ由来の圧縮空気をそのまま用いた。0.01% CO₂ あるいは 0.001% CO₂ を含む空気は、通常の空気 (0.04% CO₂) を 2N の NaOH 水溶液 100 mL にそれぞれ 1 回、2 回通気することで調整した。5% CO₂ を含む空気は、液化炭酸ガスボンベ (岩谷産業株式会社) 由来の CO₂ ガスと室外に置いたエアーコンプレッサ (尼寺空圧工業株式会社) 由来の圧縮空気を混合して調製した。0.12% CO₂ を含む空気はハイブロー (エアーポンプ) C-8000 (キョーリン) 由来の圧縮空気と液化炭酸ガスボンベ (岩谷産業株式会社) 由来の CO₂ ガスを混合して調整した。圧縮空気の流量及び混合ガスの流量と混合比は、ガス混合用流量計 (Model RK120XM; KOFLOC) と LI-7000/クロードパス CO₂/H₂O アナライザー (メイワフォーシス) を用いて調製・測定した。

培養時の光条件は、白色蛍光灯を用いて前培養時は約 60 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、通気培

養時は約 120 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光強度で照射した。光強度の測定は、Light Meter (model LI-250; LI-COR) を用いた。培養の温度は 25°C とした。

表 3-1. 本研究に用いたクラミドモナス株名と遺伝子情報

株名	遺伝子型	遺伝子発現に用いたプロモーター および 3'-UTR	文献
C9	Wild-type	N.A.	Fukuzawa et al., 2001
CC-1690	Wild-type	N.A.	Harris, 1989
CC-5325	Wild-type	N.A.	Li et al., 2016
B1	<i>lcib, AphVIII</i>	<i>AphVIII</i> の発現に <i>Hsp70A</i> と <i>RbcS2</i> のタンデムプロモーター(<i>AR</i>) と <i>RbcS2</i> の 3'-UTR を使用した。	Li et al., 2016; this study
AN-1	<i>lcib, AphVII, AphVIII, LCIB-Clover</i>	<i>AphVIII</i> の発現に <i>AR</i> プロモーターと <i>RbcS2</i> の 3'-UTR を使用した。 LCIB-Clover の発現に <i>AR</i> プロモーターと <i>RbcS2</i> の 3'-UTR を使用した。	This study
4-D1	<i>lcib, isa1, AphVII, AphVIII, LCIB-Clover, Aada</i>	<i>AphVIII</i> の発現に <i>AR</i> プロモーターと <i>RbcS2</i> の 3'-UTR を使用した。 LCIB-Clover の発現に <i>AR</i> プロモーターと <i>RbcS2</i> の 3'-UTR を使用した。	This study
C1	<i>lcib, isa1, AphVII, AphVIII, LCIB-Clover, Aada, ISA1-mCherry-3×FLAG, Ble</i>	<i>AphVIII</i> の発現に <i>AR</i> プロモーターと <i>RbcS2</i> の 3'-UTR を使用した。 LCIB-Clover の発現に <i>AR</i> プロモーターと <i>RbcS2</i> の 3'-UTR を使用した。 ISA1-CrmCHERRY-3×FLAG の発現に <i>AR</i> プロモーターと <i>RbcS2</i> の 3'-UTR を使用した。 <i>Ble</i> の発現に <i>RbcS2</i> のプロモーターと 3'-UTR を使用した。	This study
C2	<i>lcib, isa1, AphVII, AphVIII, LCIB-Clover, Aada, ISA1-mCherry-3×FLAG, Ble</i>	<i>AphVIII</i> の発現に <i>AR</i> プロモーターと <i>RbcS2</i> の 3'-UTR を使用した。 LCIB-Clover の発現に <i>AR</i> プロモーターと <i>RbcS2</i> の 3'-UTR を使用した。 ISA1-CrmCHERRY-3×FLAG の発現に <i>AR</i> プロモーターと <i>RbcS2</i> の 3'-UTR を使用した。 <i>Ble</i> の発現に <i>RbcS2</i> のプロモーターと 3'-UTR を使用した。	This study

N.A.は該当なし (not applicable) を示している。

(次頁に続く)

表 3-1. 本研究に用いたクラミドモナス株名と遺伝子情報

株名	遺伝子型	遺伝子発現に用いたプロモーター および 3'-UTR	文献
CC-4323	Wild-type	N.A.	Delrue et al., 1992; Colleoni et al., 1999a; Colleoni et al., 1999b;
<i>sta2-1</i>	<i>sta2</i>	N.A.	Delrue et al., 1992; Maddelein et al., 1994; Wattebled et al., 2002; Izumo et al., 2011
<i>sta3-1</i>	<i>sta3</i>	N.A.	Maddelein et al., 1994; Buleón et al., 1997; Ral et al., 2006
<i>sta6-1</i>	<i>cw15, arg7, sta6;</i> <i>Arg7</i>	N.A.	Ball et al., 1991; Iglesias et al., 1994; van den Koornhuysse et al., 1996; Zabawinski et al., 2001
<i>sta7-1</i>	<i>cw15, arg7, sta7;</i> <i>Arg7</i>	N.A.	Mouille et al., 1996; Ramazanov et al., 1994; Dauvillée et al., 1999; Dauvillée et al., 2001a; Posewitz et al., 2004
<i>sta11-1</i>	<i>sta11</i>	N.A.	Colleoni et al., 1999a; Colleoni et al., 1999b; Wattebled et al., 2003
<i>sta2-BC</i>	<i>sta2-1; LCIB-</i> <i>Clover, aphVII</i>	LCIB-Clover の発現に <i>AR</i> プロモーター と <i>RbcS2</i> の 3'-UTR を使用した。	This study
<i>sta3-BC</i>	<i>sta3-1; LCIB-</i> <i>Clover, aphVII</i>	LCIB-Clover の発現に <i>AR</i> プロモーター と <i>RbcS2</i> の 3'-UTR を使用した。	This study
<i>sta6-BC</i>	<i>sta6-1; LCIB-</i> <i>Clover, aphVII</i>	LCIB-Clover の発現に <i>AR</i> プロモーター と <i>RbcS2</i> の 3'-UTR を使用した。	This study
<i>sta11-BC</i>	<i>sta11-1; LCIB-</i> <i>Clover, aphVII</i>	LCIB-Clover の発現に <i>AR</i> プロモーター と <i>RbcS2</i> の 3'-UTR を使用した。	This study

N.A.は該当なし (not applicable) を示している。

交配による四分子解析

四分子解析は、顕微鏡 (BX41; Olympus) に対して NARISHIGE 社のマニピュレーターとシンガー社のニードルを付けた顕微鏡を用いて、プレート上で接合子の分離を行った。まず、B1 株 (*lcib*, *mt*⁻) と CC-1690 株 (*mt*⁺) を、1/5N 窒素源 TAP プレート上で 4 日間培養し、配偶子誘導培地で 2 回ウォッシュした後、80 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光照射下で 3 時間振とう培養した。B1 株と CC-1690 株の細胞を混合し、1 時間静置した後、細胞懸濁液 500 μL を 3% (w/v) 寒天 TAP 培地に撒き、暗所で 1 週間静置した。成熟した接合子を得るため、カミソリの刃でプレート表面の細胞を取り除き、プレート表面に残った接合子を白金糸で掻き取った。80 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光照射下で接合子をハッチングさせ、ニードルにより四分子を分離した。交配によって得られた F₁ 子株 73-4 (*lcib*, *mt*⁺) と C9 株 (*mt*⁻) を同様に交配させ、F₂ 子株 99-4 (*lcib*, *mt*⁺) を取得した。

エレクトロポレーション法によるクラミドモナス細胞の形質転換

クラミドモナスの細胞への形質転換は、Yamano et al., 2020 に従い、エレクトロポレーター NEPA21 (Nepa Gene) を用いたエレクトロポレーションを行った。対数増殖期まで振とう培養した細胞を回収し、Max Efficiency (Invitrogen) に懸濁し、細胞濃度を $1 \times 10^8 \text{ cells mL}^{-1}$ に調整した。細胞膜に孔をあけるためのポアリングパルスを電圧 300 V、パルス幅 12 ms、パルス間隔 50 ms、減衰率 10% の電気条件で、極性を正荷電にして 2 回与えた。また外来 DNA を細胞内に送り込むためのトランスファーパルスを電圧 20 V、パルス幅 50 ms、パルス間隔 50 ms、減衰率 40% の電気条件で、極性を正・負電荷で切り替えてそれぞれ 1 回与えた。エレクトロポレーション後、細胞を 40 mM のスクロースを含む TAP 液体培地 10 mL に懸濁し、ROTATOR RT-50 (TAITEC) でゆっくりと回しながら、暗所かつ 25°C で、約 14 時間回復培養を行った。回復培養後の細胞を遠心により回収し、細胞を薬剤入りの TAP 寒天プレートに撒き、80 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光照射下で培養し、コロニーを形成させた。

LCIB の局在異常株のスクリーニング

AN-1 株を親株に、上記に述べたエレクトロポレーション法によってスペクチノマイシンに耐性を付与する *aadA* 遺伝子カセットをランダムに挿入し、形質転換体を選抜した。MOPSP 培地を入れた 96 穴タイタープレートのウェルに、形質転換体 2,400 株をひとつずつ入れ、0.04% CO₂ を通気した生育チャンバーに静置して培養した。12 時間後に、24 穴の撥水性印刷スライドガラス（松浪硝子工業）を用いて、蛍光顕微鏡（Axioscope2; Zeiss）を用いて、1 株ずつ LCIB-Clover の蛍光観察を行った。このとき、蛍光観察はクラミドモナスのクロロフィル蛍光をカットできるフィルターセット（Exciter D395/40, dichroic 425DCLP, emitter D510/40; Chroma Technology）を使用した。LCIB-Clover がピレノイド周囲に集合せず、葉緑体全体に分散する変異株を選抜した。

Thermal asymmetric interlaced (TAIL)-PCR

aadA カセットが挿入する flanking 領域の下流側を増幅するため、*aadA* 遺伝子配列に特異的なプライマーを用いて、1st PCR と 2nd PCR を行った。縮重プライマーとして、A3、A5、A6 ランダムプライマーを用いた。TAIL-PCR で用いたプライマー配列は表 3-2 に示す。（Liu et al., 1995; Liu and Whittier 1995）。

挿入変異株 4-D1 の相補株の作出

ISA1-CrmCHERRY-3×FLAG 発現プラスミド（pTMZ1-ISA1）を作製するために、以下のクローニングを行った。プラスミドの形質転換は大腸菌 DH5 α コンピテントセルを用いた。クラミドモナス様に構築された発現ベクター pMO520（Onishi and Pringle, 2016）から *aphVIII* 領域を欠失させるために、PrimeSTAR Max DNA Polymerase（タカラバイオ）および *aphVIII*-deletion-F1/*aphVIII*-deletion-R1 プライマーセットを用いた inverse PCR を行い、pMO520-*aphVIII*-del プラスミドを取得した。次に、*Ble* の遺伝子配列を、pSP124S プラスミド（Lumbreras et al., 1998）を鋳型として、PrimeSTAR GXL と *ble*-fusion-F1/*ble*-fusion-R1 プライマーセットを用いて PCR 増幅を行った。PCR 産物を精製し、pMO520-*aphVIII*-del プラスミドを *PciI* 制限酵素処理した断片を、SLiCE 法（Motohashi, 2015）により連結し、pTMZ1 プラスミドを取得した。次に、当研究室が維持するゲノムライブラリーのフォスミドクローン（009-B12）を鋳型として、KOD FX Neo（TOYOBO）と

ISA1-fusion-F1/ISA1-fusion-R2 プライマーセットを用いて、*ISAI* のゲノム領域を増幅した。最後に、*ISAI* ゲノムの PCR 断片を、SLiCE 法により pTMZ1 を *HpaI* 制限酵素処理した断片と連結し、pTMZ1-ISA1 プラスミドを取得した。pTMZ1-ISA1 プラスミドを上記に述べたエレクトロポレーション法によって 4-D1 株へ形質転換し、 $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ゼオシンを含む TAP プレートで形質転換体を選抜した。

クロロフィル濃度ならびにタンパク質の定量法

クラミドモナスの細胞溶液を遠心分離 (4°C , $17,000\times\text{g}$, 1 分) により回収し、95 % エタノール溶液に懸濁して 10 秒間ボルテックスし、クロロフィルを抽出した。再び遠心分離 (4°C , $17,000\times\text{g}$, 1 分) した溶液の上清画分の 665 nm と 649 nm の吸光度を測定し、以下の計算式 (Wintermans and de Mot, 1965) に従ってクロロフィル濃度を定量した。

$$\text{クロロフィル濃度 } (\mu\text{g Chl mL}^{-1}) = 6.1\times A_{665} + 20.04\times A_{649}$$

クラミドモナス細胞を遠心分離 (4°C , $800\times\text{g}$, 5 分) により回収し、Complete protease inhibitor cocktail (Roche) を含む PBS buffer (137 mM NaCl , 2.7 mM KCl , $10 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, $2 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$, $\text{pH}7.4$) に懸濁した。タンパク質の抽出方法は、可溶性タンパク質である LCIB と LCIC は可溶性画分を抽出し、それ以外のタンパク質は全タンパク質を抽出して泳動に用いた。

可溶性画分の抽出および定量は、以下の方法に従った。ハンディソニケーター (UR-20P; TOMY) を用いて超音波処理を行い、氷上で細胞を破碎した。遠心分離 (4°C , $17,000\times\text{g}$, 20 分) により細胞残渣を除去し、上清を可溶性タンパク質画分とした。タンパク質の濃度はウシ血清アルブミン (Bovine serum albumin: BSA) を基準とした Bradford 法により測定した。粉碎した細胞に $2\times\text{SDS Gel-loading}$ バッファー (50 mM Tris-HCl ($\text{pH} 8.0$), 25% グリセロール (v/v), 2% SDS (w/v), 0.1% BPB)、 100 mM DTT を加え、 65°C で 10 分インキュベートし、BSA $10 \mu\text{g}$ に相当するタンパク質量を泳動に使用した。

全タンパク質の抽出および定量は、以下の方法に従った。細胞を破碎する前に、細胞溶液のクロロフィル濃度を測定した。超音波処理により細胞を破碎し、 $2\times\text{SDS Gel-loading}$ バッファー (50 mM Tris-HCl ($\text{pH} 8.0$), 25% グリセロール (v/v), 2% SDS (w/v), 0.1% BPB)、 100 mM DTT を加え、 37°C で 30 分インキュベートした。遠心 ($17,000\times\text{g}$,

3分)により細胞残渣を除去し、上清をサンプルとした。クロロフィル量1 μ g分(HLA3検出時のみ2 μ g分)を泳動した。

ウェスタンブロッティング

タンパク質のブロッティング操作は、Wang et al., 2016に従った。一次抗体は以下の希釈率でPBS-Tに希釈した。rabbit anti-LCIB: 5,000倍希釈、rabbit anti-LCIC: 10,000倍希釈、rabbit anti-LCIA: 5,000倍希釈、rabbit anti-HLA3: 1,000倍希釈、rabbit anti-Histone H3: 20,000倍希釈、mouse anti-FLAG: 10,000倍希釈、rabbit anti-RbcL: 10,000倍希釈、chicken anti-LCI5: 2,000倍希釈。二次抗体については、以下の希釈率でPBS-Tに希釈した。Goat Anti-Rabbit IgG Antibody, HRP-conjugate (Life Technologies) : 10,000倍希釈、goat anti-mouse IgG antibody (Life Technologies) : 10,000倍希釈、goat anti-chicken IgY-HRP (Santa Cruz Biotechnology) : 5,000倍希釈。二次抗体反応後、PBS-Tで4回洗浄した後、Luminata Crescendo Western HRP Substrate (MILLIPORE)をPVDF膜に滴下して1分置き、発光をImageQuant LAS-4010 (GE-healthcare)を用いて検出した。

共焦点レーザー顕微鏡を用いた高解像度蛍光観察

超高感度HyD検出器を備えた共焦点レーザー顕微鏡TCS SP8 (Leica)を用いて、LCIB-Clover蛍光シグナルを観察した。高解像度の画像を取得するため、取得した蛍光画像をHuygens Essentialソフトウェア(Scientific Volume Imaging B.V.)と組み合わせたHuygensデコンボリューションを実行した(Yamano et al., 2018)。LCIB-Cloverの局在観察は、励起波長488 nm、蛍光波長500-530 nm、レーザーパワー0.5%、gain 80%で検出した。Huygensデコンボリューションを実行するため、共焦点顕微鏡の設定は、対物レンズは63倍、ピンホールサイズは0.6 Airy units、z-stackのスキャン間隔は150 nm、ピクセルサイズは50 nm以下、スキャン速度は200 Hzで行なった。Huygens Essentialソフトウェアの設定は、Classic maximum likelihood estimation (CMLE)のアルゴリズムで、Maximum iterationsは100回、Signal-to-noise比(S/N比)は20、Quality criterionは0.05で行なった。

LCIB-Clover 局在パターンの定量化

LCIB の局在パターンを定量化するため、葉緑体内における LCIB-Clover 蛍光シグナルの蛍光強度の変動係数 (coefficient of variation: CV 値) を算出した (Nitta et al., 2018)。CV 値は以下の式で求められる。

$$\text{CV 値} = \text{標準偏差 } (\sigma) / \text{平均値 } (\mu)$$

クロロフィル自家蛍光像および LCIB-Clover 蛍光シグナル像を用いて、ImageJ (Fiji) でピクセル当たりの LCIB-Clover 蛍光強度の σ および μ を解析した。具体的には、まずクロロフィル自家蛍光像において、ピレノイドを除いた葉緑体の範囲を region of interest (ROI) に定義し、LCIB-Clover 蛍光シグナル像にエクスポートした。ROI における LCIB-Clover 蛍光強度の σ および μ を解析し、CV 値を算出した。LCIB-Clover 蛍光強度の CV 値の統計解析には、GraphPad Prism8 ソフトウェア上で、ノンパラメトリックな統計手法である Kruskal-Wallis 法を用いて一元配置分散分析を行った後、Dunn 法による多重比較検定を行った。

デンプンのヨウ素染色および定量解析

デンプンの蓄積を視覚的に確認するために、Posewitz et al., 2004 のヨウ素染色の方法を改良し、デンプンの蓄積レベルを定性した。5 mL の TAP 培地で前培養を行い、0.04% CO₂ 通気条件に移してから 24 時間後の細胞溶液 (OD₇₃₀=0.6–1.0) を遠心により回収し (600×g, 5 分)、95% (v/v) のエタノールを加えボルテックスし、クロロフィルの脱色を行った。脱色後の細胞を回収し (22,100×g, 5 分)、細胞のペレットに 3 mL の水を加えた。細胞内のデンプンを抽出・可溶化するため、オートクレーブにより 121°C、1 分間加熱した。オートクレーブ後は、氷上で冷却し、10 μL のヨウ素液 (0.05 M; Wako) を添加した。

細胞内のデンプン蓄積レベルは Total Starch Assay Kit (AA/AMG; Megazyme) を用いて定量した。細胞溶液 45 mL を遠心により回収し (600×g, 5 分)、95% エタノール 1 mL を添加・懸濁した。キャップ付きチューブに全量移し、製品プロトコルに従った。酵素活性の測定は、Power Scan 4 (DS pharma biomedical) により 510 nm の吸光度を測定し、以下の計算式に従ってデンプン量を算出した。

$$\text{デンプン量 (mg)} = (\text{OD}_{510 \text{ sample}} - \text{OD}_{510 \text{ blank}}) \times 100 / \text{OD}_{510 \text{ Glu}} \times 1.21 / 0.1 \times 1 / 1000 \times 162 / 180$$

デンプン定量の前に、粒子計数分析装置 CDA-1000 (シスメックス) により、細胞溶液中の細胞体積を測定した。求めたデンプン量 (μg) を細胞体積 (mm^3) で除することで、細胞体積当たりのデンプン量に換算した。

培地中の溶存無機炭素濃度の測定

培地中の溶存無機炭素濃度の測定は、Birmingham and Colman, 1979 に従った。測定値のキャリブレーションには超純水および $200 \mu\text{M Na}_2\text{CO}_3$ 標準溶液を使用した。クロマトパッケレコーダー (島津製作所) の測定パラメーターは、WIDTH 5、MIN.AREA 10、SPEED 10、ATTEN 2 に設定した。細胞を含む培地中の無機炭素濃度を測定する場合、細胞溶液 1 mL を 1.5 mL チューブに移して遠心により回収し ($17,000 \times g$, 1 分)、上清を新しい 1.5 mL チューブに移した。次に、メタナイザー (MTN-1; 島津製作所) が備わったガスクロマトグラフィ (GC-8A; 島津製作所) に上清を、 $10 \mu\text{L}$ ずつ 5 回インジェクトした。 CO_2 濃度は以下のヘンダーソン・ハッセルバルヒの式により算出した (図 2-3)。

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log_{10}([\text{HCO}_3^-] / [\text{CO}_2])$$

炭酸の第一段階目の解離定数 $\text{pKa} = 6.35$ を式に代入すると、 $\text{pH} 7.0$ 条件での $\text{HCO}_3^- / \text{CO}_2$ 比は 4.47 となる。このようにして、各 pH における C_i 、 HCO_3^- および CO_2 濃度を算出した。

透過型電子顕微鏡 (TEM)

クラミドモナス細胞は、化学固定法によって固定した。観察に用いる細胞を 5 mL の TAP 培地で前培養を行い、 $0.04\% \text{ CO}_2$ 通気条件に移してから 24 時間後の細胞 ($\text{OD}_{730} = 0.6 - 1.0$) を回収した。細胞固定液 (0.1 M リン酸バッファー, 4% パラホルムアルデヒド, 2% グルタルアルデヒド) は、 0.2 M リン酸バッファーを 25 mL 、 12% (w/v) パラホルムアルデヒド水溶液を 16.6 mL 、 25% (w/v) グルタルアルデヒドを 4 mL 、滅菌水を 4.4 mL を混合して調整した。細胞溶液を遠心により回収し ($600g$, 5 分)、ペレットに 4.5 mL の細胞固定液を加えて懸濁し、氷上で 4 時間静置した。このとき、1 時間おきに、軽く振

り混ぜた。2 mL のチューブ 3 本に分注して遠心後 (12,500×g, 3 分)、上清を除去し、0.1 M リン酸バッファーで 2 回ウォッシュした。最後に 0.1 M リン酸バッファーを 60 μL 添加し、ペレットを崩して、一つのチューブにまとめて氷上に置いた。

低融点アガロースの SeaPlaque™ アガロース (ロンザジャパン) を 70°C で溶かして、45°C で溶かしておいた。0.4 mL のマイクロチューブ (QSP) に細胞溶液を 50 μL 入れ、その上から溶かしたアガロースを 200 μL 入れ、遠心した (12,500×g, 35 秒間)。チューブの底の先端を切断し、細胞密度が高い寒天部分を取得した。2 mm 程度の寒天に包埋した細胞は、細胞固定液 1 mL を含む 2 mL チューブに移して、4°C で一晩保存した。その後、0.1 M リン酸バッファーで 2 回ウォッシュし、室温で 3 時間、細胞の後固定液反応 (0.1 M リン酸バッファー+1% (w/v) 四酸化オスミウム) を行った。再び 0.1 M リン酸バッファーで 2 回ウォッシュし、30%、50%、60%、70%、80%、90%、99%、100% のエタノールに 20 分ずつ反応させ、段階的に脱水した。その後、酸化プロピレン (ナカライ) に浸漬し、酸化プロピレン:LUVEAK-812 (Nacalai Tesque) を 3:1、1:1、1:3 の 3 段階でそれぞれ 90 分間反応させた後、エポキシ樹脂 (Epon 812 resin) に包埋した (5°C 一晩後、60°C 二晩)。透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察する超薄切片は、ウルトラミクロトーム EM UC6 (ライカ) を使用して作製した。超薄切片を酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛で染色し、透過型電子顕微鏡 H-7650 (Hitachi) を使用し、倍率 12,000 倍で観察した。

デンブン鞘の面積の算出

ピレノイド周囲のデンブン鞘の面積は ImageJ (Fiji) を用いて算出した。電子顕微鏡画像を二値化し、デンブン鞘部分を黒色で示した。デンブン鞘を Area Selection Tool によって縁取り、黒色領域の面積を算出した。

酸素電極を用いた酸素発生速度測定

MOPSP 培地へ 5% CO₂ および 0.04% CO₂ を通気して培養したクラミドモナス細胞を遠心により回収し (600×g, 5 分, 25°C)、測定する細胞のクロロフィル量が 10 μg から 12 μg になるよう、50 mM HEPES バッファー (pH 7.8) または 50 mM MES バッファー (pH 6.2) に懸濁した。HEPES バッファーおよび MES バッファーは、あらかじめ加熱しながら

ら N₂ ガスを通気して CO₂ と O₂ を脱気したものを用いた。1.5 mL の細胞懸濁液をクラークタイプ酸素電極 (Hansatech Instruments) に入れ、350 μmol photons m⁻² s⁻¹ の白色光を照射しながら 14 分間 N₂ ガスを通気し、細胞懸濁液中の溶存無機炭素を枯渇させた。その後、750 μmol photons m⁻² s⁻¹ の白色光を照射しながら NaHCO₃⁻ 溶液を 10 μM から 10 mM まで 30 秒ごとに段階的に添加し、酸素発生速度を酸素電極により測定した。酸素発生量はレコーダー LR4220 (Yokogawa) を用いて記録した。この結果から、最大酸素発生速度 (V_{max}) 及び V_{max} の半分の速度を示す溶存 Ci 濃度 K_{0.5} (Ci) を算出した。

スポットテストによる生育判定

MOPSP 培地に 5% CO₂ 通気で培養したクラミドモナス細胞を、OD₇₃₀ が 0.30、0.15、0.07 になるように調整し、MOPSP 寒天培地へ 3 μL ずつスポットした。細胞をスポットした寒天培地を、5% CO₂、0.04% CO₂、0.01% CO₂ を通気したチャンバーに入れ、3 日後以降、1 日ごとに写真を撮りながら 4~6 日間培養した。このとき、120 μmol photons m⁻² s⁻¹ の光強度で培養した。

クラミドモナス細胞からの全 RNA 抽出法

クラミドモナス細胞溶液 50 mL を遠心により回収し (600×g, 5 分)、TE バッファーを 200 μL 添加して懸濁した。液体窒素に細胞懸濁液を滴下して凍結させ、-80°C で保存した。4°C で冷やした乳鉢と乳棒を用いて細胞を破碎した。抽出 RNA を DNase I 処理し、さらに RNeasy Plant Mini kit (QIAGEN) を用いて製品プロトコルに従い精製した。

qRT-PCR による遺伝子発現量

5 μg の精製 RNA を鋳型に、SuperScript™ IV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher) を用いた逆転写により、cDNA を合成した。RNA/DNA ハイブリッド二本鎖を変性させるため、96°C、5 分間で反応を行い、氷上で急冷した後、RNaseA を添加した (反応時の濃度: 10 μg/mL)。cDNA は DNA 精製して使用した。精製した cDNA 2 μg 分と TB Green® Premix Ex Taq™ GC (Perfect Real Time; タカラバイオ) を混ぜて、CFX96 real-time system C1000 Touch thermal cycler (BIO-RAD) を用いてリアルタイム PCR を行なった。本研究で用いたプライマー配列は表 3-2 に示した。

表 3-2. 本論文で使用したプライマー配列

Primer name	Sequence (5' to 3' direction)
LCIB-F2	GACCATGGGCGTTGATGACTTC
LCIB-R3	AGCTAGCTCTCACCACCCCATAC
DP-1	GAGGAGTTCGTGCACTACGTCAAGG
DP-2	GAAGGTCGTGGGCAGTATCTAGACG
UP-1	GTTTCCAGCAGGTCGTTGATGAGAG
UP-2	GTCACGAGCAGGTCGATGTCC
A3	WGTGNAGWANCANAGA
A5	AGWGNAGWANCAWAGG
A6	STTGNTASTNCTNTGC
F6	AGAGGGTGAAAGAAAGGGGGTTTAC
R6	AGTCCTGTACATCTACAAATCTTGACAAC
aadA-ATG-less-F	GCTCGGGAGGCCGTGATTGCGGAGGTCT
pHyg-R2	TCAGCACTTGAGAGCAGTATCTTCCAT
aphVIII-deletion-F1	ACGGAGCGATGCTATCAAGGCCTTGG
aphVIII-deletion-R1	ATAGCATCGCTCCGTGTAAATGGAG
ble-fusion-F1	GGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGCCAGAAGGAGCGCAGCC
ble-fusion-R1	TTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTGCTTCAAATACGCCCAGC
ISA1-fusion-F1	TTGCAGGAGATTCGAGGTTCTTCTGCAAGCCCCTGGCCT
ISA1-fusion-R2	CCTCGCCCTTGGACACCATCTTGATCATGCTTGTGGCGG
HLA3-qF2	GTGCAGCAGACCATCAAGAA
HLA3-qR2	GACCAGCTTGGAGAACATGG
LCIA-qF2	TCTCCGTGGGAGGCAACATC
LCIA-qR2	ACAGACCCACGGGGAACACC
CblpF	AGGTCTGGAACCTGACCAACT
CblpR	AAGCACAGGCAGTGGATGA
ISA1-qF2	GTGGCAGCTGTCGTCTCTG
ISA1-qR2	CTTCCTCAGCGCCTCGTT

参考文献

Atkinson N, Feike D, Mackinder LCM, Meyer MT, Griffiths H, Jonikas MC, Smith AM, McCormick AJ (2016) Introducing an algal carbon-concentrating mechanism into higher plants: Location and incorporation of key components. *Plant Biotechnol J* **14**: 1302–1315

Atkinson N, Velanis CN, Wunder T, Clarke DJ, Mueller-Cajar O, McCormick AJ, Sharwood R (2019) The pyrenoidal linker protein EPYC1 phase separates with hybrid *Arabidopsis-Chlamydomonas* Rubisco through interactions with the algal Rubisco small subunit. *J Exp Bot* **70**: 5271–5285

Badger MR, Kaplan A, Berry JA (1980) Internal inorganic carbon pool of *Chlamydomonas reinhardtii*-evidence for a carbon-dioxide concentrating mechanism. *Plant Physiol* **66**: 407–413

Badger MR, Andrews TH, Whitney SM, Ludwig M, Yellowlees DC, Leggat W, Price GD (1998) The diversity and coevolution of Rubisco, plastids, pyrenoids and chloroplast-based CO₂-concentrating mechanisms in the algae. *Canadian Journal of Botany* **76**: 1052–1071

Ball S, Marianne T, Dirick L, Fresnoy M, Delrue B, Decq A (1991) A *Chlamydomonas reinhardtii* low-starch mutant is defective for 3-phosphoglycerate activation and orthophosphate inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Planta* **185**: 17–26

Birmingham BC, Colman B (1979) Measurement of Carbon Dioxide Compensation Points of Freshwater Algae. *Plant Physiol* **64**: 892–895

Bobik TA, Lehman BP, Yeates TO (2015) Bacterial microcompartments: widespread prokaryotic organelles for isolation and optimization of metabolic pathways. *Mol Microbiol* **98**: 193–207

Borkhsenius ON, Mason CB, Moroney JV (1998) The intracellular localization of ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygenase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **116**: 1585–91

Buleón A, Gallant DJ, Bouchet B, Mouille G, D’Hulst C, Kossmann J, and Ball S (1997) Starches from A to C—*Chlamydomonas reinhardtii* as a model microbial system to investigate the biosynthesis of the plant amylopectin crystal. *Plant Physiol.* **115**: 949–957

Cameron JC, Wilson SC, Bernstein SL, Kerfeld CA (2013) Biogenesis of a bacterial organelle: the carboxysome assembly pathway. *Cell* **155**: 1131–1140

Colleoni C, Dauvillée D, Mouille G, Buléon A, Gallant D, Bouchet B, Morell M, Samuel M, Delrue B, d’Hulst C, et al (1999a) Genetic and biochemical evidence for the involvement of α -1,4 glucanotransferases in amylopectin synthesis. *Plant Physiol* **120**: 993–1003

- Colleoni C, Dauvillée D, Mouille G, Morell M, Samuel M, Slomiany MC, Liénard L, Wattedled F, D’Hulst C, Ball S** (1999b) Biochemical characterization of the *Chlamydomonas reinhardtii* α -1,4 glucanotransferase supports a direct function in amylopectin biosynthesis. *Plant Physiol.* **120**: 1005–1013
- Dauvillée D, Colleoni C, Shaw E, Mouille G, D’Hulst C, Morell M, Samuel MS, Bouchet B, Gallant DJ, Sinskey A, et al** (1999) Novel, Starch-Like Polysaccharides Are Synthesized by an Unbound Form of Granule-Bound Starch Synthase in Glycogen-Accumulating Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **119**: 321–330
- Dauvillée D, Colleoni C, Mouille G, Buléon A, Gallant DJ, Bouchet B, Morell MK, D’Hulst C, Myers AM, Ball SG** (2001a) Two loci control phytylglycogen production in the monocellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **125**: 1710–1722
- Dauvillée D, Colleoni C, Mouille G, Morell MK, D’Hulst C, Wattedled F, Liénard L, Delvalle D, Ral JP, Myers AM, Ball SG** (2001b) Biochemical characterization of wild-type and mutant isoamylases of *Chlamydomonas reinhardtii* supports a function of the multimeric enzyme organization in amylopectin maturation. *Plant Physiol.* **125**: 1723–1731
- Delrue B, Fontaine T, Routier F, Decq A, Wieruszeski JM, van den Koornhuysse N, Maddelein ML, Fournet B, Ball S** (1992) Waxy *Chlamydomonas reinhardtii*: Monocellular algal mutants defective in amylose biosynthesis and granule-bound starch synthase activity accumulate a structurally modified amylopectin. *J Bacteriol* **174**: 3612–3620
- Duanmu D, Wang Y, Spalding MH** (2009) Thylakoid Lumen Carbonic Anhydrase (CAH3) Mutation Suppresses Air-Dier Phenotype of LCIB Mutant in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **149**: 929–937
- Dutcher SK** (1995) Mating and tetrad analysis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Methods Cell Biol.* **47**: 531–540
- Emanuelsson O, Nielsen H, Heijne von G** (1999) ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci* **8**: 978–984
- Engel BD, Schaffer M, Cuellar LK, Villa E, Plitzko JM, Baumeister W** (2015) Native architecture of the *Chlamydomonas* chloroplast revealed by in situ cryo-electron tomography. *eLife* **4**: e04889
- Engineer CB, Hashimoto-Sugimoto M, Negi J, Israelsson-Nordstrom M, Azoulay-Shemer T, Rappel WJ, Iba K, Schroeder JI** (2016) CO₂ sensing and CO₂ regulation of stomata conductance: advances and open questions. *Trends Plant Sci.* **21**: 16–30

- Fang W, Si Y, Douglass S, Casero D, Merchant SS, Pellegrini M, Ladunga I, Liu P, Spalding MH** (2012) Transcriptome-Wide Changes in *Chlamydomonas reinhardtii* Gene Expression Regulated by Carbon Dioxide and the CO₂-Concentrating Mechanism Regulator CIA5/CCM1. *Plant Cell* **24**: 1876–1893
- Freeman Rosenzweig ES, Xu B, Kuhn Cuellar L, Martinez-Sanchez A, Schaffer M, Strauss M, Cartwright HN, Ronceray P, Plitzko JM, Förster F, Wingreen NS, Engel BD, Mackinder LCM, Jonikas MC** (2017) The Eukaryotic CO₂-Concentrating Organelle Is Liquid-like and Exhibits Dynamic Reorganization. *Cell* **171**: 148–162.e19
- Fridlyand L, Kaplan A, Reinhold L** (1996). Quantitative evaluation of the role of a putative CO₂-scavenging entity in the cyanobacterial CO₂-concentrating mechanism. *Biosystems*, **37**: 229–238
- Fukuzawa H, Ishizaki K, Miura K, Matsueda S, Ino-ue T, Kucho K, Ohyama K** (1998) Isolation and characterization of high-CO₂ requiring mutants from *Chlamydomonas reinhardtii* by gene tagging. *Can J Bot* **76**: 1092–1097
- Fukuzawa H, Miura K, Ishizaki K, Kucho K, Saito T, Kohinata T, Ohyama K** (2001) Ccm1, a regulatory gene controlling the induction of a carbon-concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii* by sensing CO₂ availability. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 5347–5352
- Greiner A, Kelterborn S, Evers H, Kreimer G, Sizova I, Hegemann P** (2017) Targeting of photoreceptor genes in *Chlamydomonas reinhardtii* via zinc-finger nucleases and CRISPR/Cas9. *Plant Cell* **29**: 2498–2518
- Hanba YT, Shibasaki M, Hayashi Y, Hayakawa T, Kasamo K, Terashima I, Katsuhara M** (2004) Overexpression of the barley aquaporin HvPIP2;1 increases internal CO₂ conductance and CO₂ assimilation in the leaves of transgenic rice plants. *Plant Cell Physiol*. **45**: 521–529
- Harris EH** (1989) The *Chlamydomonas* Source Book: A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use. San Diego: CA: Academic Press.
- Hogetsu D, Miyachi S** (1977) Effects of CO₂ concentration during growth on subsequent photosynthetic CO₂ fixation in *Chlorella*. *Plant Cell Physiol* **18**: 347–352
- Iglesias AA, Charng Y, Ball S, Preiss J** (1994) Characterization of the kinetic, regulatory, and structural properties of ADP-glucose pyrophosphorylase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol*. **104**: 1287–1294

Itakura AK, Chan KX, Atkinson N, Pallesen L, Wang L, Reeves G, Patena W, Caspari O, Roth R, Goodenough U, et al (2019) A Rubisco-binding protein is required for normal pyrenoid number and starch sheath morphology in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA* **116**: 18445–18454

Izumo A, Fujiwara S, Sakurai T, Ball SG, Ishii Y, Ono H, Yoshida M, Fujita N, Nakamura Y, Buléon A, et al (2011) Effects of granule-bound starch synthase I-defective mutation on the morphology and structure of pyrenoidal starch in *Chlamydomonas*. *Plant Sci* **180**: 238–245

Jin S, Sun J, Wunder T, Tang D, Cousins AB, Sze SK, Mueller-Cajar O, Gao YG (2016) Structural insights into the LCIB protein family reveals a new group of β -carbonic anhydrases. *Proc Natl Acad Sci USA* **113**: 14716–14721

Jinkerson RE, Jonikas MC (2015) Molecular techniques to interrogate and edit the *Chlamydomonas* nuclear genome. *Plant J*. **82**: 393–412

Johnson AA, Guzewicz KE, Lee CJ, Kalathur RC, Pulido JS, Marmorstein LY, Marmorstein AD (2017) Bestrophin 1 and retinal disease. *Prog Retin Eye Res*. **58**: 45–69

Jones HG (1992) Plants and microclimate: A quantitative approach to environmental plant physiology Ed 2 (Cambridge University Press Cambridge UK).

Jordan DB, Ogren WL (1981) Species variation in the specificity of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase. *Nature* **291**: 513–515

Kaplan A, Badger MR, Berry JA (1980) Photosynthesis and intracellular inorganic carbon pool in the blue-green algae *Anabaena variabilis*: response to external CO₂ concentration. *Planta* **149**: 219–226

Karlsson J, Clarke AK, Chen ZY, Huggins SY, Park YI, Husic HD, Moroney JV, Samuelsson G (1998) A novel α -type carbonic anhydrase associated with the thylakoid membrane in *Chlamydomonas reinhardtii* is required for growth at ambient CO₂. *EMBO J* **17**: 1208–1216

Kerfeld CA, Erbilgin O (2015) Bacterial microcompartments and the modular construction of microbial metabolism. *Trends Microbiol* **23**: 22–34

Kerfeld CA, Melnicki MR (2016) Assembly, function and evolution of cyanobacterial carboxysomes. *Curr Opin Plant Biol* **31**: 66–75

Kikutani S, Nakajima K, Nagasato C, Tsuji Y, Miyatake A, Matsuda Y (2016) Thylakoid luminal θ -carbonic anhydrase critical for growth and photosynthesis in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**: 9828–9833

- Kuchitsu K, Tsuzuki M, Miyachi S** (1988) Changes of starch localization within the chloroplast induced by changes in CO₂ concentration during growth of *Chlamydomonas reinhardtii*: independent regulation of pyrenoid starch and stroma starch. *Plant Cell Physiol* **29**: 1269–1278
- Kuchitsu K, Tsuzuki M, Miyachi S** (1991) Polypeptide composition and enzyme activities of the pyrenoid and its regulation by CO₂ concentration in unicellular green algae. *Can J Bot* **69**: 1062–1069
- Lauersen KJ, Kruse O, Mussnug JH** (2015) Targeted expression of nuclear transgenes in *Chlamydomonas reinhardtii* with a versatile, modular vector toolkit. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**: 3491–3503
- Li FW, Villarreal JC, Szövényi P** (2017) Hornworts: An Overlooked Window into Carbon-Concentrating Mechanisms. *Trends Plant Sci* **22**: 275–277
- Li X, Zhang R, Patena W, Gang SS, Blum SR, Ivanova N, Yue R, Robertson JM, Lefebvre PA, Fitz-Gibbon ST, et al** (2016) An indexed, mapped mutant library enables reverse genetics studies of biological processes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* **28**: 367–387
- Libessart N, Maddelein ML, van den Koornhuise N, Decq A, Delrue B, Mouille G, D’Hulst C, and Ball S** (1995) Storage, photosynthesis, and growth: the conditional nature of mutations affecting starch synthesis and structure in *Chlamydomonas*. *Plant Cell* **7**: 1117–1127
- Lin MT, Occhialini A, Andralojc PJ, Parry MAJ, Hanson MR** (2014) A faster Rubisco with potential to increase photosynthesis in crops. *Nature* **513**: 547–550
- Liu YG, Mitsukawa N, Oosumi T, Whittier RF** (1995) Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J* **8**: 457–463
- Liu YG, Whittier RF** (1995) Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics* **25**: 674–681
- Lumbreras V, Stevens DR, Purton S** (1998) Efficient foreign gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* mediated by an endogenous intron. *Plant J* **14**: 441–447
- Mackinder LCM, Meyer MT, Mettler-Altmann T, Chen VK, Mitchell MC, Caspari O, Freeman Rosenzweig ES, Pallesen L, Reeves G, Itakura A, et al** (2016) A repeat protein links Rubisco to form the eukaryotic carbon-concentrating organelle. *Proc Natl Acad Sci USA* **113**: 5958–5963

Mackinder LCM, Chen C, Leib RD, Patena W, Blum SR, Rodman M, Ramundo S, Adams CM, Jonikas MC (2017) A spatial interactome reveals the protein organization of the algal CO₂-concentrating mechanism. *Cell* **171**: 133–147.e14

Mackinder LCM (2018) The *Chlamydomonas* CO₂-concentrating mechanism and its potential for engineering photosynthesis in plants. *New Phytol* **217**: 54–61

Maddelain ML, Libessart N, Bellanger F, Delrue B, D’Hulst C, van den Koornhuysen N, Fontaine T, Wieruszkeski JM, Decq A, Ball S (1994) Toward an understanding of the biogenesis of the starch granule. Determination of granule-bound and soluble starch synthase functions in amylopectin synthesis. *J. Biol. Chem.* **269**: 25150–25157

Marcus Y, Schuster G, Michaels A, Kaplan A (1986) Adaptation to CO₂ levels and changes in the phosphorylation of thylakoid proteins during the cell cycle of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **80**: 604–607

McKay RML, Gibbs SP (1991) Composition and function of pyrenoids: cytochemical and immunocytochemical approaches. *Can J Bot* **69**: 1040–1052

Merchant SS, Prochnik SE, Vallon O, Harris EH, Karpowicz SJ et al. (2007) The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* **318**: 245–250

Meyer MT, Whittaker C, Griffiths H (2017) The algal pyrenoid: key unanswered questions. *J Exp Bot* **68**: 3739–3749

Meslet-Cladière L, Vallon O (2011) Novel shuttle markers for nuclear transformation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell* **10**: 1670–1678

Mitchell MC, Meyer MT, Griffiths H (2014) Dynamics of carbon-concentrating mechanism induction and protein relocalization during the dark-to-light transition in synchronized *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **166**: 1073–82

Mitra M, Mason CB, Xiao Y, Ynalvez RA, Lato SM, Moroney JV (2005) The carbonic anhydrase gene families of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Can J Bot* **83**: 780–795

Miura K, Yamano T, Yoshioka S, Kohinata T, Inoue Y, Taniguchi F, Asamizu E, Nakamura Y, Tabata S, Yamato KT, et al (2004) Expression profiling-based identification of CO₂-responsive genes regulated by CCM1 controlling a carbon-concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **135**: 1595–1607

Moroney JV, Tolbert NE (1985) Inorganic Carbon Uptake by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **77**: 253–258

Motohashi K (2015) A simple and efficient seamless DNA cloning method using SLiCE from *Escherichia coli* laboratory strains and its application to SLiP site-directed mutagenesis. *BMC Biotechnol* **15**: 47

Mouille G, Maddelein ML, Libessart N, Talaga P, Decq A, Delrue B, Ball S (1996) Preamylopectin processing: A mandatory step for starch biosynthesis in plants. *Plant Cell* **8**: 1353–1366

Mukherjee A, Lau CS, Walker CE, Rai AK, Prejean CI, Yates G, Emrich-Mills T, Lemoine SG, Vinyard DJ, Mackinder LCM, et al (2019) Thylakoid localized bestrophin-like proteins are essential for the CO₂ concentrating mechanism of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA* **116**: 16915–16920

Nitta N, Sugimura T, Isozaki A, Mikami H, Hiraki K, Sakuma S, Iino T, Arai F, Endo T, Fujiwaki Y, et al (2018) Intelligent image-activated cell sorting. *Cell* **175**: 266–276.e13

Ohad I, Siekevitz P, Palade GE (1967) Biogenesis of chloroplast membranes. I. Plastid dedifferentiation in a dark-grown algal mutant (*Chlamydomonas reinhardtii*). *J Cell Biol* **35**: 521–552

Onishi M, Pringle JR (2016) Robust transgene expression from bicistronic mRNA in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *G3 (Bethesda)* **6**: 4115–4125

Paul MJ, Foyer CH (2001) Sink regulation of photosynthesis. *J Exp Bot* **52**: 1383–1400

Plumed MP, Villarejo A, Rios A, García-Reina G, Ramazanov Z (1996) The CO₂-concentrating mechanisms in a starchless mutant of the green alga *Chlorella pyrenoidosa*. *Planta* **200**: 28–31

Posewitz MC, Smolinski SL, Kanakagiri S, Melis A, Seibert M, Ghirardi ML (2004) Hydrogen photoproduction is attenuated by disruption of an isoamylase gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* **16**: 2151–2163

Qu Z, Hartzell HC (2008) Bestrophin Cl⁻ channels are highly permeable to HCO₃⁻. *Am J Physiol Cell Physiol* **294**: 1–17

Rae BD, Long BM, Badger MR, Price GD (2013) Functions, compositions, and evolution of the two types of carboxysomes: polyhedral microcompartments that facilitate CO₂ fixation in cyanobacteria and some proteobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **77**: 357–379

Ral JP, Colleoni C, Wattedled F, Dauvillée D, Nempont C, Deschamps P, Li Z, Morell MK, Chibbar R, Purton S, et al (2006) Circadian clock regulation of starch metabolism establishes GBSSI as a major contributor to amylopectin synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **142**: 305–317

- Ramazanov Z, Rawat M, Henk MC, Mason CB, Matthews SW, Moroney JV** (1994) The induction of the CO₂-concentrating mechanism is correlated with the formation of the starch sheath around the pyrenoid of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* **195**: 210–216
- Raven JA** (1997) Putting the C in phycology. *Eur J Phycol* **32**: 319–333
- Raven JA** (2003) Carboxysomes and peptidoglycan walls of cyanobacteria: possible physiological functions. *Eur J Phycol* **38**: 47–53
- Sager R, Granick S** (1953) Nutritional studies with *Chlamydomonas reinhardtii*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **56**: 831–838
- Schmitz** (1882) *Die Chromatophoren der Algen. Verh Nat Ver Preuss. Rheinlande u. Westfalen, Bonn* **40**: 154–155
- Shimogawara K, Fujiwara S, Grossman A, Usuda H** (1998) High-efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. *Genetics* **148**: 1821–1828
- Sim L, Henriksen A, Beeren SR, Ball SG, Dauvillée D, Findinier J, Palcic MM** (2014) Crystal Structure of the *Chlamydomonas* Starch Debranching Enzyme Isoamylase ISA1 Reveals Insights into the Mechanism of Branch Trimming and Complex Assembly. *J Biol Chem* **289**: 22991–23003
- Smith EC, Griffiths** (1996) A pyrenoid-based carbon-concentrating mechanism is present in terrestrial bryophytes of the class Anthocerotae. *Planta* **200**: 203–212
- Sun J, Okita TW, Edwards GE** (1999) Modification of carbon partitioning, photosynthetic capacity, and O₂ sensitivity in *Arabidopsis* plants with low ADP-glucose pyrophosphorylase activity. *Plant Physiol* **119**: 267–276
- Tirumani S, Kokkanti M, Chaudhari V, Shukla M, Rao BJ** (2014) Regulation of CCM genes in *Chlamydomonas reinhardtii* during conditions of light-dark cycles in synchronous cultures. *Plant Mol Biol* **85**: 277–286
- Uehlein N, Lovisolo C, Siefritz F, Kaldenhoff R** (2003) The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO₂ pore with physiological functions. *Nature* **425**: 734–737
- Updike DL, Hachey SJ, Kreher J, Strome S** (2011) P granules extend the nuclear pore complex environment in the *C. elegans* germ line. *J Cell Biol* **192**: 939–948
- van den Koornhuysen N, Libessart N, Delrue B, Zabawinski C, Decq A, Iglesias A, Preiss J, Ball S** (1996) Control of starch composition and structure through substrate supply in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* **271**: 16281–16287

- Villarejo A, Martinez F, del Pino Plumed M, Ramazanov Z** (1996) The induction of the CO₂ concentrating mechanism in a starch-less mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Physiol Plant* **98**: 798–802
- Wang L, Yamano T, Kajikawa M, Hirono M, Fukuzawa H** (2014) Isolation and characterization of novel high-CO₂-requiring mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynth. Res.* **121**: 175–184
- Wang L, Yamano T, Takane S, Niikawa Y, Toyokawa C, Ozawa SI, Tokutsu R, Takahashi Y, Minagawa J, Kanasaki Y, et al** (2016) Chloroplast-mediated regulation of CO₂-concentrating mechanism by Ca²⁺-binding protein CAS in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA* **113**: 12586–12591
- Wang Y, Sun Z, Horken KM, Im CS, Xiang Y, Grossman AR, Weeks DP** (2005) Analysis of CIA5, the master regulator of the carbon-concentrating mechanisms in *Chlamydomonas reinhardtii*, and its control of gene expression. *Can J Bot* **83**: 765–779
- Wang Y, Spalding MH** (2006) An inorganic carbon transport system responsible for acclimation specific to air levels of CO₂ in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 10110–10115
- Wang Y, Spalding MH** (2014a) Acclimation to very low CO₂: Contribution of limiting CO₂ inducible proteins, LCIB and LCIA, to inorganic carbon uptake in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **166**: 2040–2050
- Wang Y, Spalding MH** (2014b) LCIB in the *Chlamydomonas* CO₂-concentrating mechanism. *Photosynth Res* **121**: 185–192
- Wattebled F, Buleón A, Bouchet B, Ral, JP, Lienard L, Delvalle D, Binderup K, Dauvillée D, Ball S, D'Hulst C** (2002). Granule-bound starch synthase I–A major enzyme involved in the biogenesis of B-crystallites in starch granules. *Eur. J. Biochem.* **269**: 3810–3820
- Wattebled F, Ral JP, Dauvillée D, Myers AM, James MG, Schlichting R, Giersch C, Ball S, D'Hulst C** (2003) STA11, a *Chlamydomonas reinhardtii* locus required for normal starch granule biogenesis, encodes disproportionating enzyme. Further evidence for a function of α -1,4 glucanotransferases during starch granule biosynthesis in green algae. *Plant Physiol.* **132**: 137–145
- Wintermans JF, de Mot A** (1965) Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their pheophytins in ethanol. *Biochim. Biophys. Acta.* **109**: 448–453
- Wunder T, Cheng SLH, Lai SK, Li HY, Mueller-Cajar O** (2018) The phase separation underlying the pyrenoid-based microalgal Rubisco supercharger. *Nat Commun* **9**: 5076

Yamano T, Miura K, Fukuzawa H (2008) Expression analysis of genes associated with the induction of the carbon-concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **147**: 340–354

Yamano T, Fukuzawa H (2009) Carbon-concentrating mechanism in a green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, revealed by transcriptome analyses. *J Basic Microbiol* **49**: 42–51

Yamano T, Tsujikawa T, Hatano K, Ozawa SI, Takahashi Y, Fukuzawa H (2010) Light and low-CO₂-dependent LCIB-LCIC complex localization in the chloroplast supports the carbon-concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol* **51**: 1453–1468

Yamano T, Iguchi H, Fukuzawa H (2013) Rapid transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* without cell-wall removal. *J. Biosci. Bioeng.* **115**: 691–694

Yamano T, Asada A, Sato E, Fukuzawa H (2014) Isolation and characterization of mutants defective in the localization of LCIB, an essential factor for the carbon-concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynth Res* **121**: 193–200

Yamano T, Sato E, Iguchi H, Fukuda Y, Fukuzawa H (2015) Characterization of cooperative bicarbonate uptake into chloroplast stroma in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**: 7315–7320

Yamano T, Toyokawa C, Fukuzawa H (2018) High-resolution suborganellar localization of Ca²⁺-binding protein CAS, a novel regulator of CO₂-concentrating mechanism. *Protoplasma* **255**: 1015–1022

Yamano T and Fukuzawa H (2020) Transformation of the Model Microalga *Chlamydomonas reinhardtii* Without Cell-Wall Removal. *Methods Mol Biol.* **2050**: 155–161

Yeates TO, Crowley CS, Tanaka S (2010) Bacterial microcompartment organelles: protein shell structure and evolution. *Annual Rev Biophys* **39**: 185205

Yu K, Xiao Q, Cui G, Lee A, Hartzell HC (2008) The best disease-linked Cl⁻ channel *hBest1* regulates Cav1 (L-type) Ca²⁺-channels via src-homology-binding domains. *J Neurosci* **28**: 5660–5670

Zabawinski C, van den Koornhuysen N, D’Hulst C, Schlichting R, Giersch C, Delrue B, Lacroix JM, Preiss J, Ball S (2001) Starchless mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* lack the small subunit of a heterotetrameric ADP-glucose pyrophosphorylase. *J. Bacteriol.* **183**: 1069–1077

Zhan Y, Marchand CH, Maes A, Mauries A, Sun Y, Dhaliwal JS, Uniacke J, Arragain S, Jiang H, Gold ND, et al (2018) Pyrenoid functions revealed by proteomics in *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLoS One* **13**: e0185039

Zhang J, Fu XX, Li RQ, Zhao X, Liu Y, Li MH, Zwaenepoel A, Ma H, Goffinet B, Guan YL, Xue JY, et al (2020) The hornwort genome and early land plant evolution. *Nat Plants*. doi: 10.1038/s41477-019-0588-4

謝辞

はじめに、私が本研究を進めるにあたり、多大なるご指導を頂きました、京都大学大学院生命科学研究科 福澤秀哉教授と山野隆志講師に、心より感謝申し上げます。私が大学院に入学してから5年もの間、熱心にご指導頂いたご恩は生涯忘れません。

福澤秀哉教授には、サイエンスに対して真剣に向き合う姿勢を教わりました。研究のことはもちろんですが、研究室の皆を家族のように思い、時に厳しく時に優しくご指導いただきました。山野隆志講師には、休日や時間帯も関係なく四六時中、研究についてご指導いただきました。研究を進める上で必要とされる思考力、情報收拾力、文章力など重要なことを叩き込んでいただきました。

京都大学大学院生命科学研究科 辻敬典助教には1年間という短い期間にも関わらず、大変お世話になりました。私の研究の論文化にあたり、広い観点から様々なご助言をいただきました。最後の1年間を、辻敬典助教と過ごせたこと、大変嬉しかったです。心より感謝申し上げます。

近畿大学 梶川昌孝講師には4年間もの間、親身にご指導・ご提言を頂きました。また研究へのストイックな姿勢は、研究者の鑑と感じていました。何度も励ましていただいたおかげで、諦めずに研究へと取り組むことができました。心より感謝申し上げます。

京都大学大学院医学研究科総合解剖センター電子顕微鏡室 古田敬子様、幸田晴康様には、透過型電子顕微鏡による細胞観察でお世話になりました。京都大学生命科学研究科 岩野恵先生には、電子顕微鏡観察の試料作製について貴重なご助言を頂きました。これらの方々に、深く感謝申し上げます。

所属する福澤研究室の皆様にもお世話になりました。松岡俊樹氏には、ガスクロマトフラフィ測定の手助けを頂きました。また、京都大学理学研究科の西村明洋氏には、オフィスアシスタントとして、変異株スクリーニングの親株を作出していただきました。

水原初枝さん、幸田理江さん、松田頼子さん、河村綾子さん、森田寛子さん、井口ひろさんには、培地作製やPCRなどの実験の補助と事務面で大変お世話になり、研究生生活を支えて頂きました。改めて感謝申し上げます。

他にも、多くの福澤研究室のメンバーの方々および、生命科学研究科の方々に、公私共々支えて頂きました。素晴らしい人々と出会い、非常に充実した研究環境の中で研究に専念できたことを、心より感謝申し上げます。

最後に、研究生活を送る間、温かく応援してくれた家族の皆様に感謝します。本当にありがとうございました。

2020年2月17日

豊川 知華

本論文は、以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Toyokawa C, Yamano T, Fukuzawa H

Pyrenoid Starch Sheath Is Required for LCIB Localization and the CO₂-Concentrating Mechanism in Green Algae.

Plant Physiology 182(4): 1883–1893 (2020)

その他学術雑誌に発表した論文

Yamano T, **Toyokawa C**, Fukuzawa H

High-resolution suborganellar localization of Ca²⁺-binding protein CAS, a novel regulator of CO₂-concentrating mechanism.

Protoplasma 255(4):1015–1022 (2018)

Nitta N, Sugimura T, Isozaki A, Mikami H, Hiraki K, Sakuma S, Iino T, Arai F, Endo T, Fujiwaki Y, Fukuzawa H, Hase M, Hayakawa T, Hiramatsu K, Hoshino Y, Inaba M, Ito T, Karakawa H, Kasai Y, Koizumi K, Lee SW, Lei C, Li M, Maeno T, Matsusaka S, Murakami D, Nakagawa A, Oguchi Y, Oikawa M, Ota T, Shiba K, Shintaku H, Shirasaki Y, Suga K, Suzuki Y, Suzuki N, Tanaka Y, Tezuka H, **Toyokawa C**, Yalikun Y, Yamada M, Yamagishi M, Yamano T, Yasumoto A, Yatomi Y, Yazawa M, Carlo DD, Hosokawa Y, Uemura S, Ozeki Y, and Goda K
Intelligent Image-Activated Cell Sorting.

Cell 175(1): 266–276 (2018)

Wang L, Yamano T, Takane T, Niikawa Y, **Toyokawa C**, Ozawa S, Tokutsu R, Takahashi Y, Minagawa J, Kanesaki Y, Yoshikawa H, Fukuzawa H

Chloroplast-mediated regulation of CO₂-concentrating mechanism by Ca²⁺-binding protein CAS in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 113(44):12586–12591 (2016)